GENETICA ȘI CANCERUL

DRAGOȘ ȘTEFĂNESCU GEORGE CĂLIN

III 242.031

Dr. Dragoş T. Ştefănescu Dr. George A. Călin

GENETICA ŞI CANCERUL

(ELEMENTE DE GENETICĂ ŞI PATOLOGIE MOLECULARĂ)

288319
B.C.U. IASI

EDITURA DIDACTICĂ ŞI PEDAGOGICĂ, R.A.
BUCUREŞTI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.09.1996
B.C.U. „M. EMINESCU"
— I A Ş I —
acu 779.704

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-30-4495-4

Redactor: RODICA MIHAILESCU, MIHAELA SCARLAT
Tehnoredactor: ION MIREA
Coperta: ELENA DRAGULELEI-DUMITRU

CUPRINS

1. ASPECTE CITOGENETICE ALE BOLII NEOPLAZICE (Dr. Dragoş Ştefănescu)
1.1. Importanţa oncocitogeneticii 9
1.2. Succintă prezentare a nomenclaturii cromozomilor şi a terminologiei citogeneticii 9
1.2.1. Modelele de benzi cromozomiale permit identificarea precisă a cromozomilor 11
1.2.2. Simbolurile utilizate în descrierea aberaţiilor cromozomiale 11
1.2.2.1. Anomaliile numerice 11
1.2.2.2. Aberaţiile structurale 11
1.2.2.3. Alte modificări citogenetice întâlnite în celulele neoplazice 13
1.3. Caracterul clonal al aberaţiilor cromozomiale din neoplasmele umane 14
1.3.1. Anomaliile clonale sunt prezente şi în neoplaziile benigne 15
1.3.2. Există tumori în care anomaliile cromozomiale nu sunt decelabile 16
1.3.3. Semnificaţia etiopatogenică a aberaţiilor cromozomiale din cancere 16
1.4. Conceptul de instabilitate cromozomială 17
1.4.1. Scurtarea telomerelor generează instabilitate cromozomială 18
1.5. Situsurile fragile — biomarkeri ai predispoziţiei genetice la cancer 20
1.6. Conceptul de evoluţie cariotipică 20
1.7. Aspectele citogenetice ale hemolimfoproliferărilor maligne 22
1.7.1. Boli mieloproliferative 24
1.7.1.1. Leucemiile acute nelimfocitare (LANL) 24
1.7.1.2. Sindroamele mielodisplazice primare (SMD) 24
1.7.1.3. Sindroame mielodisplazice şi leucemii secundare 29
1.7.1.4. Leucemia mieloidă cronică (LMC) 29
1.7.2. Boli limfoproliferative 30
1.7.2.1. Leucemii acute limfoblastice (LAL) 31
1.7.2.2. Leucemia limfocitară cronică cu celule B (LLC-B) 31
1.7.2.3. Limfoamele maligne nehodgkiniene (LMNH) 35
1.7.2.4. Limfomul Hodgkin 36
1.8. Aspecte citogenetice ale tumorilor solide 37
1.8.1. Tumori benigne 38
1.8.2. Tumori maligne 38
1.8.3. Importanţa clinică a citogeneticii tumorilor solide 39
46

2. ASPECTE MOLECULARE ALE GENETICII BOLII NEOPLAZICE (Dr. Dragoş Ştefănescu, Dr. George Călin) 49
2.1. Cancerul — boala genetică cu cel mai complex mecanism patogenic 49
2.1.1. Celulele maligne sunt purtătoare ale unor anomalii cromozomiale neîntâmplătoare 50
2.1.2. Unele cancere se transmit ereditar, iar unele sindroame ereditare se asociază cu risc crescut de dezvoltare a cancerului 50
2.1.2.1. Sindroame neoplazice transmisibile ereditar 50
2.1.2.2. Sindroame ereditare asociate cu risc crescut de apariţie a cancerului 51
2.1.3. Diferenţe condiţionate genetic în răspunsul la acţiunea agenţilor care produc leziuni ADN 53
2.1.4. Diferite categorii de viruşi pot induce tumori interferând cu aparatul genetic al celulei gazdă 54
2.1.5. Alterările genetice — factori iniţiatori ai procesului malign 55
2.1.5.1. Transgenicitate 56
2.2. Tumorigeneza — un proces multistadial 58
2.2.1. Evoluţia tumorilor comportă achiziţia secvenţială de noi alterări genetice şi epigenetice 58

2.2.2. Dominanță și recesivitate în exprimarea fenotipică a genelor implicate în cancer 59
2.2.3. Oncogenele nu figurează în inventarul de gene al celulelor normale 61
2.2.4. Proteinele specificate de oncogene sunt componente esențiale ale circuitelor de semnalizare intracelulară 64
2.2.5. Activarea protooncogenelor se realizează printr-un număr limitat de mecanisme 75
2.2.5.1. Inserția virală 76
2.2.5.2. Rearanjările cromozomiale neîntâmplătoare 77
2.2.5.3. Amplificarea genică 80
2.2.5.4. Mutațiile genice 83
2.2.6. Oncoproteinele acționează printr-un număr limitat de mecanisme asupra unor substraturi extrem de diferite 85
2.2.6.1. Fosforilarea proteinelor 85
2.2.6.2. Transmiterea semnalelor prin GTP-aze 86
2.2.6.3. Controlul transcrierii ADN 86
2.2.7. Activitatea unei singure oncogene nu este suficientă pentru transformarea malignă 88
2.2.8. Celulele maligne posedă „căi de transformare" alcătuite din oncoproteine conectate funcțional 91
2.2.8.1. Calea Ras în celulele normale 92
2.2.8.2. Calea Ras în celulele maligne 96
2.2.9. În genomul celulelor normale se află gene care inhibă apariția tumorilor 96
2.2.9.1. Experimentele de hibridizare a celulelor somatice 98
2.2.9.2. Pierderea heterozigozității — eveniment cu certă semnificație oncogenică 99
2.2.9.3. Studiul cancerelor ereditare 100
2.2.9.4. Sindroame neoplazice cu transmitere ereditară 101
2.2.10. Proteinele codificate de genele de supresie a creșterii tumorale sunt prezente în toate compartimentele celulei normale și au funcții variate 105
2.2.11. Genele de supresie a creșterii tumorale sunt indispensabile supraviețuirii celulelor normale 111
2.2.12. Tumorigeneza la om comportă, obligatoriu, inactivarea unor gene de supresie a creșterii tumorale 114
2.2.13. Unele oncoproteine virale blochează funcționarea produșilor proteici ai genelor supresoare ale creșterii tumorale 119
2.2.14. p53 — singura genă supresoare adevărată? 120
2.2.14.1. Importanța genei p53 120
2.2.14.2. Descriere succintă a genei p53 și a proteinei P53 122
2.2.14.3. Rolurile p53 în celula normală 123
2.2.14.4. Alterările p53 în neoplaziile umane 126
2.2.14.5. Un model posibil al tumorigenezei prin p53 129
2.2.15. O serie de gene funcționează atât ca oncogene, cât și ca gene supresoare ale creșterii tumorale 131
2.2.16. Mutațiile genelor de stabilitate se asociază cu apariția cancerului 133
2.2.17. Modele genetice ale tumorigenezei umane 137
2.2.17.1. Modelul genetic al dezvoltării cancerelor pediatrice . . 138
2.2.17.1.1. Amprentarea genomică (genomic imprinting): implicații posibile în etiopatogeneza cancerelor . . 139
2.2.17.1.2. Amprentarea genomică și patologia umană . . 141
2.2.17.2. Modelul genetic al dezvoltării cancerelor rectocolonice (CRC) 142
2.2.17.2.1. Modificări cariotipice în CRC 143
2.2.17.2.2. Alterări genice în CRC 144
2.2.17.2.3. Procesul de metastazare se află sub control genetic dar genele răspunzătoare nu sunt încă identificate 146
2.2.17.2.4. Aplicații clinice ale geneticii moleculare în cancerele colorectale 148
Bibliografie selectivă 151

PREFAȚĂ

Iată o carte pe care o aşteptam de mult. De care medicina noastră are acută nevoie. După decenii de eforturi mai mult sau mai puțin fructuoase, începem să înțelegem cancerul, această mare obsesie a biologiei — și a medicinei — evident. Aproape firesc, am spune acum, explicația trebuie să o aducă genetica. Nu s-a afirmat oare de atâtea ori că medicina începe cu gena și se termină cu gena? Și totuși, până foarte recent, puțini bănuiau că și cancerul este genetic. Era o erezie de vreme ce experimentatorii demonstrau că se pot obține ușor cancere. Unde mai este ereditatea? Răspunsul este acum simplu — pretutindeni. În mutațiile germinale pe care le transmit părinții și care își încep opera devastatoare când se pierde heterozigoția... în inactivarea genelor supresoare ale cancerului... în anomaliile genelor stabilizatoare... în deficiențele sistemelor de reparare a ADN-ului... Iar genele sunt permanent prezente — și în rezistența la citostatice, și în metastazare.

Cancerul este una dintre fațetele noii genetici. El poate fi decriptat numai cu conceptele geneticii. Și toate elementele indispensabile înțelegerii cancerului se găsesc în sinteza de față. Fără îndoială — remarcabilă. Ea reflectă deosebit de clar ceea ce înseamnă genetica tumorilor maligne. Nu lipsește nimic sau — știu eu? — aproape nimic. Se vorbește despre cromozomi, gene, proteine (oncoproteine), despre patogenia cancerului, despre predispoziție... despre apoptoză...

Toți cei ce vor să știe unde se găsește oncogenetica trebuie să citească această sinteză. Mai mult — trebuie s-o citească toți cei ce urmăresc drumurile medicinei. Pentru că ceva s-a schimbat.

Da, această carte trebuia să vină.

PROFESOR DR. **CONSTANTIN MAXIMILIAN**
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI ROMÂNE

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Cancerul este o boală genetică. Leziunile răspunzătoare de inițierea, promovarea și progresiunea procesului malign își au sediul la nivelul moleculelor informaționale ADN. Aceste leziuni sunt reprezentate de alterări mutaționale ale unor gene care guvernează realizarea programelor de creștere, proliferare, diferențiere, apoptoză și menținere a stabilității genomice. Mutațiile suferite de o astfel de genă perturbă desfășurarea ordonată și integrată a activităților din cadrul unuia sau mai multor programe celulare. Urmarea o constituie „dezinserția socială" a celulelor purtătoare ale mutației care, dobândindu-și capacitatea de a se sustrage constrângerilor impuse de mecanismele de control integrativ, vor deveni autonome. Autonomizarea corespunde primei etape a dezvoltării neoplaziilor.

Cancerul este un proces multistadial. Realizarea plenară a fenotipului malign comportă parcurgerea unui număr de etape caracterizate prin achiziția de mutații genice adiționale și prin intervenția unor mecanisme epigenetice. O singură mutație este incapabilă să genereze cancer; transformarea malignă reclamă producerea a cel puțin două mutații. Ulterior transformării, instabilitatea genomică — trăsătură definitorie a celulei canceroase — va favoriza producerea și acumularea unor multiple alterări genetice care, acționând în cooperare, vor dota secvențial celulele cu toate atributele malignității. Din clona inițială emerg continuu noi variante, selecția naturală reținându-le pe cele mai agresive și mai rezistente. Procesul microevoluționar al dezvoltării cancerului se încheie prin dobândirea potențialului invaziv și metastazant.

Numărul genelor potențial capabile să intervină în apariția și dezvoltarea cancerului este de ordinul sutelor. Ele se clasifică în trei categorii: protooncogenele care, prin activare în oncogene dominante, determină transformarea celulei purtătoare; antioncogenele recesive, a căror inactivare alelică conferă celulelor capacitatea proliferării nelimitate; genele „de stabilitate", ale căror mutații au ca rezultat eșecul reparării leziunilor ADN apărute spontan sau induse de agenții mezologici: destabilizarea consecutivă a genomului generează un număr foarte mare de mutații, dintre care unele — interesând protooncogene sau antioncogene — vor accelera evoluția tumorilor.

Modificările cromozomiale (rearanjări, deleții, amplificări) prin intermediul cărora se realizează alterarea genelor implicate în cancer constituie obiectul de studiu al oncocitogeneticii. Investigațiile citogenetice în cancere au, pe lângă o importanță teoretică majoră, și o aplicabilitate clinică imediată: ele furnizează elemente utile pentru stabilirea diagnosticului și prognosticului, iar în cazul hemopatiilor maligne fac posibilă monitorizarea tratamentului.

Modificările structurale și funcționale ale genelor și ale produșilor proteici ai acestora sunt studiate prin metodele geneticii moleculare. Investigațiile moleculare sunt singurele în măsură să permită abordarea rațională a etiopatogeniei, atât de complexă, a bolii canceroase. Cunoașterea aprofundată a mecanismelor genetice condiționează atât înțelegerea multiplelor aspecte ale biologiei celulei canceroase, cât și interpretarea corectă a variatelor trăsături fenotipice și manifestări clinice ale tumorilor maligne. Cunoașterea acestor mecanisme creează premisele elaborării de noi strategii terapeutice și a unor metodologii obiective și înalt informative de diagnostic al bolii canceroase.

Genetica bolii canceroase este un domeniu caracterizat printr-o dinamică extrem de viguroasă. Volumul informațiilor referitoare la aspectele citogenetice și moleculare ale acestei boli se află într-un proces de creștere exponențială. Rata descoperirilor depășește, de multe ori, capacitatea de conceptualizare, iar un anumit grad de fluiditate a concepțiilor este inerent ritmului înalt de acumulare a datelor.

Lucrarea de față nu își propune o prezentare exhaustivă a cunoștințelor actuale despre citogenetica și genetica moleculară a cancerului. Ea conține, în schimb, principalele categorii de date — aduse până la nivelul de început al anului 1995 — care fundamentează conceptele curente ale oncogeneticii, și care pot fi utile nu numai specialiștilor oncologi, ci și tuturor celor interesați să pătrundă în intimitatea fenomenelor prin care se realizează apariția și dezvoltarea tumorilor maligne.

AUTORII

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITARĂ

1. ASPECTE CITOGENETICE ALE BOLII NEOPLAZICE

1.1. IMPORTANȚA ONCOCITOGENETICII

Prin valoarea informațiilor pe care le furnizează, analiza cromozomială continuă să reprezinte un instrument major de investigare a biologiei cancerului. Începând din 1971 — anul în care au fost introduse metodele de inducere a modelelor de benzi cromozomiale — și până în prezent, citogenetica a produs un volum uriaș de date; au fost repertoriate profilurile cariotipice a peste 15 000 de neoplazii maligne și au fost evidențiate relațiile specifice existente între aceste profiluri și diferitele tipuri anatomoclinice de cancere.

În ultimii ani, analiza cromozomială și-a dobândit o nouă dimensiune, conferită de cuplarea metodelor uzuale ale citogeneticii cu tehnicile biologiei moleculare: indicând amplasarea pe cromozomi a unor secvențe ADN prezumabil implicate în etiopatogenia cancerelor, citogenetica participă direct la identificarea și elucidarea funcției oncogenelor și a genelor supresoare ale creșterii tumorale (antioncogene).

Conceptualizările operate asupra vastului material informativ furnizat de investigarea aspectelor citogenetice ale proliferărilor maligne au condus la formularea a 4 concluzii cu un implicit caracter generalizator.

1) Tumorile maligne se caracterizează, în marea lor majoritate, prin existența unor anomalii cromozomiale care nu sunt niciodată prezente în celulele normale ale organismului purtător al tumorii.

2) Într-o tumoră (de un anumit tip), toate celulele neoplazice sunt — de regulă — purtătoare ale aceleiași modificări citogenetice, la care, în timp, se pot adăuga, uneori, și alte modificări, mai complexe, aparent derivate din cele inițiale.

3) Anomaliile cromozomiale sunt cu atât mai extinse cu cât tumora se află într-un stadiu mai avansat.

4) Alterările cromozomiale sunt — de multe ori — diferite chiar între tumori histologic similare, însă configurația cariotipică aberantă rezultă din rearanjări genomice cert neîntâmplătoare.

Observațiile citogenetice pe baza cărora au fost efectuate primele două generalizări se constituie ca parte semnificativă a corpului de informații care atestă rolul major al mutației somatice în tumorigeneză. Observațiile care demonstrează că toate celulele unei tumori conțin modificări cromozomiale identice reprezintă, în conjuncție cu datele moleculare, biochimice și imunologice, un argument convingător în sprijinul conceptului originii unicelulare a neoplasmelor.

A treia generalizare este de natură să edifice asupra modului în care se realizează progresiunea biologică și clinică a tumorilor, și anume prin emergența dintr-o clonă neoplazică a unor subpopulații celulare cu alterări genetice din ce în ce mai ample și mai profunde, dintre care unele caracterizate printr-o agresivitate crescută. Dotați cu avantaj selectiv, progenii unor astfel de celule devin prevalenți în populația neoplazică, sporind rata de creștere și, implicit, accelerând progresiunea tumorii.

Acest mod de evoluție este amplu documentat de observațiile efectuate în leucemia granulocitară cronică. În stadiul indolent al bolii, singura modificare prezentă în celulele maligne este cromozomul Ph^1. În faza terminală, accelerată, a bolii, pe lângă populația inițială Ph^1, apar una sau mai multe subclone având modificări cariotipice adiționale. Secvențe similare de evenimente au fost observate și în alte tumori umane și experimentale.

Demonstrând coexistența în neoplasmele avansate a mai multor subpopulații de celule, studiile citogenetice au oferit o explicație pertinentă pentru importantul fenomen biologic și clinic al heterogenității fenotipurilor maligne din tumorile aflate în stadii târzii de dezvoltare.

A patra generalizare este cea care suscită interesul actual pentru investigațiile citogenetice în cancere. Constatarea că alterări specifice, produse la nivelul unor regiuni bine determinate ale anumitor cromozomi, sunt asociate cu tipuri morfoclinice distincte de tumori, a sugerat ipoteza că aceste alterări ar indica regiuni ale genomului în care sunt localizate gene importante pentru procesul carcinogenezei. Această ipoteză a fost pe deplin confirmată (vezi capitolul 2).

Pe lângă contribuția esențială la dezvoltarea cunoștințelor în domeniul biologiei cancerului, citogenetica s-a dovedit a fi capabilă să furnizeze informații care, coroborate cu datele de imunomorfologie și citochimie, sunt în măsură să participe decisiv la rezolvarea multora dintre problemele practicii oncologice.

Există în prezent un acord unanim în a se considera că introducerea examenului cromozomial în ansamblul investigațiilor practicate la bolnavii cu neoplazii se impune în modul cel mai necesar deoarece:

— este demonstrat că acest examen poate conduce la optimizarea diagnosticului, la evaluarea mai corectă a prognosticului și la eficientizarea tratamentului;

— oferind criterii obiective și adecvate, citogenetica poate contribui substanțial la îmbunătățirea clasificărilor actuale ale bolilor neoplazice;

— permițând aprecierea gradului remisiunii și anticiparea momentului recăderii, examenul cromozomial se recomandă ca fiind un instrument util de monitorizare a bolnavilor cu hemopatii maligne.

Medicii oncologi și comunitatea medicală în general sunt încă insuficient informați asupra amplelor posibilități ale citogeneticii. Din acest motiv, recursul la investigarea citogenetică a tumorilor maligne nu este decât unul sporadic. În consecință, capitolul de față își propune să prezinte specialiștilor din domeniul oncologiei: a) conceptele de bază ale oncocitogeneticii și b) modificările cromozomiale cele mai frecvent întâlnite în neoplazii, cu accent asupra corelațiilor dintre subtipurile morfologice și aspectele citogenetice.

1.2. SUCCINTĂ PREZENTARE A NOMENCLATURII CROMOZOMILOR ŞI A TERMINOLOGIEI CITOGENETICII

1.2.1. MODELELE DE BENZI CROMOZOMIALE PERMIT IDENTIFICAREA PRECISĂ A CROMOZOMILOR

Cei 46 de cromozomi ai complementului uman (dispuşi în 22 de perechi de autozomi şi o pereche de sexcromozomi, XX la femeie şi XY la bărbat) se individualizează prin aspectul lor morfologic (lungime, poziţia centromerului, unele repere), dar stabilirea riguros exactă a apartenenţei unui cromozom la o anumită pereche este posibilă numai prin analiza structurii lui interne.

Diferenţierea longitudinală a unui cromozom (inaparentă în cazul colorаţiilor convenţionale) poate fi indusă prin utilizarea unor proceduri colectiv denumite tehnici de bandare. Cromozomii metafazici cărora li se aplică o astfel de procedură apar a fi alcătuiţi dintr-o serie continuă de benzi transversale cu afinităţi tinctoriale diferite: unele se colorează intens (benzi întunecate), altele se colorează slab (benzi clare). Între benzi nu există zone cu tinctorialitate intermediară.

Numărul şi mărimea benzilor variază cu gradul de compactare a cromozomilor, dar fiecare cromozom are modelul său propriu de benzi (figura 1.1). Membrii unei perechi cromozomiale (cromozomi omologi) au modele similare de benzi.

Unele benzi constante, având o anumită densitate a colorării, împreună cu centromerii (constricţia primară) şi cu telomerele (capetele cromozomilor) constituie repere cromozomiale. Între două repere succesive se delimitează regiuni cromozomiale.

Potrivit sistemului internaţional pentru nomenclatura citogenetică, fiecare cromozom este împărţit prin centromer într-un braţ scurt şi unul lung (desemnate cu literele p şi, respectiv, q), iar braţele cromozomiale sunt, la rândul lor, împărţite prin repere în mai multe regiuni. Într-un cromozom, regiunile sau benzile sunt numerotate începând de la centromer şi continuând către telomere. Pentru desemnarea unei benzi se notează numărul cromozomului, simbolul braţului, numărul regiunii şi numărul benzii, nedespărţite prin semne de punctuaţie. De exemplu, 14q32 indică cromozomul 14, braţul lung, regiunea 3, banda 2. Dacă în interiorul unei benzi sunt decelabile subbenzi, acestea sunt desemnate prin numere adiţionale separate prin punct de numărul benzii respective (14q32.1). Numerotarea subbenzilor se face, de asemenea, de la centromer către telomere.

1.2.2. SIMBOLURILE UTILIZATE ÎN DESCRIEREA ABERAŢIILOR CROMOZOMIALE

1.2.2.1. Anomaliile numerice

Anomaliile numerice generate prin pierderea sau adiţia unor cromozomi se notează plasând semnele „—“ sau „+“ înaintea cromozomilor respectivi. De exemplu, notaţia 46 XX, —7, +8 arată că celula are 46 de

cromozomi, un complement sexcromozomial feminin, lipsa unui cromozom 7 și adiția unui cromozom 8, iar notația 47 XX, +22 indică un extracromozom în perechea 22.

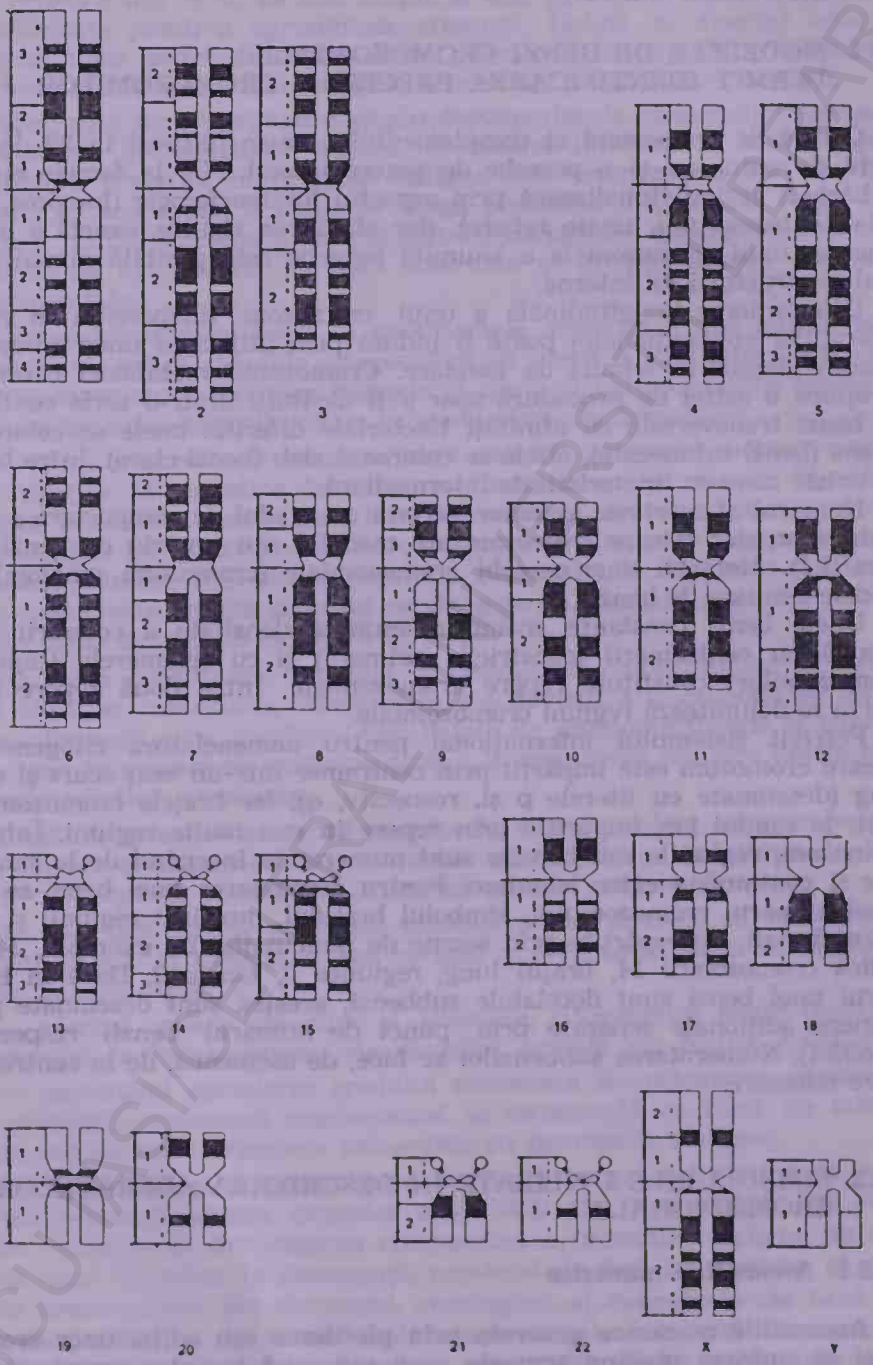


Fig. 1.1. Idiograma cromozomilor umani.

Devierile în plus sau în minus de la numărul modal de cromozomi definesc aneuploidia și se datorează, în marea majoritate a cazurilor, nondisjuncției mitotice sau întârzierii anafazice. Fenomenul nondisjuncției conduce la apariția unei celule monosomice (absența unui cromozom dintr-o pereche) și a unei celule trisomice (prezența unui cromozom suplimentar în perechea respectivă). În celulele nemaligne monosomiile autozomilor sunt incompatibile cu supraviețuirea; în celulele canceroase, monosomiile nu par a afecta funcțiile vitale. Trisomiile celulelor maligne nu diminuează viabilitatea ci, prin dezechilibrele genice pe care le produc, pot chiar să confere avantaj selectiv celulelor purtătoare. Ca urmare a unor nondisjuncții succesive este posibilă apariția într-o celulă a mai multor extracopii ale unui cromozom (polisomie), dar și coapariția de monosomii sau polisomii ale altor cromozomi. Nondisjuncția se produce frecvent în celulele canceroase deoarece transformarea malignă se asociază cu disfuncționalități ale aparatului mitotic și cu perturbări ale procesului de clivare a centromerilor.

Prezența cromozomilor supranumerari — hiperdiploidia — este caracteristică unor forme de leucemii, iar numere modale mai mici de 46 — hipodiploidia — se întâlnesc mai ales în meningioame.

Nondisjuncția nu este singurul mecanism al aneuploidizării: unii cromozomi supranumerari, a căror origine nu poate fi întotdeauna stabilită, denumiți cromozomi markeri, rezultă, probabil, prin endoreduplicări izolate.

Termenul de heteroploidie definește deviațiile numerice în celule cu grade înalte de ploidie (triploide, tetraploide); produsă îndeosebi în cursul evoluției clonale, heteroploidia este rar observată în faza de debut a bolii canceroase.

1.2.2.2. Aberațiile structurale

Aberațiile structurale sunt consecința producerii unor rupturi ale filamentelor cromozomiale, urmată de reunirea capetelor rupte într-o ordine diferită de cea inițială.

Evenimentul primar în formarea oricărei aberații structurale este, așadar, ruperea cromozomilor. Reunirea ilegitimă a capetelor rupte conduce la apariția unor configurații cromozomiale aberante, denumite rearanjări sau schimburi. Pentru formarea unei rearanjări sunt necesare cel puțin două rupturi, situate pe același cromozom sau pe cromozomi diferiți. Când cele două rupturi se află pe același cromozom, reunirea aberantă se soldează cu rearanjări numite intracromozomiale. Acestea apar frecvent în celulele canceroase și sunt reprezentate de:

— deleții interstițiale, a căror formare comportă producerea a două rupturi la nivelul aceluiași braț cromozomial și fuzionarea capetelor rupte după excluderea segmentului dintre rupturi. Analiza preparatelor cu benzi precizează locul în care s-au produs rupturile; cromozomul deletat apare a fi mai scurt decât omologul său. Delețiile sunt notate cu simbolul „del". De exemplu, 46, XY del(3)(p14p23) indică pierderea segmentului cuprins între p14 și p23.

— inelari centrici, formați ca urmare a producerii unor duble rupturi (una pe fiecare braț cromozomial) și a reunirii capetelor libere ale segmentului situat între rupturi. Simbolul este „r"; notația 46, XX, r(14)(p13q13)

indică fuzionarea capetelor rupte și formarea consecutivă a unei structuri inelare.

— inversiunile, care pot fi paracentrice (când rupturile sunt situate pe același braț) și pericentrice (când rupturile se află de o parte și de alta a centromerului); segmentul dintre cele două rupturi suferă o rotație cu 180°, urmată de sudarea capetelor rupte; 46, XX, inv(5)(p14q35) semnifică o inversiune pericentrică la nivelul cromozomului 5.

Rearanjările intercromozomiale presupun interacțiunea unor rupturi situate pe cromozomi diferiți. Dintre acestea, cele mai frecvent observate în neoplazii sunt translocațiile, a căror formare implică ruperea a doi sau mai mulți cromozomi, urmată de schimbul reciproc sau nereciproc al segmentelor rupte. Translocațiile se notează folosind simbolul „t", urmat de o primă paranteză care cuprinde cromozomii participanți la translocație, separați între ei prin semnul „ ; ", și de a doua paranteză, în care sunt înscrise punctele de rupere, separate, de asemenea, prin semnul „ ; ". De exemplu: 46, XX, t(9;22)(q34;q11).

Reunirea aberantă a segmentelor situate proximal față de rupturile produse pe doi cromozomi diferiți realizează o configurație dicentrică al cărei simbol este „dic". De exemplu: dic(9;12)(p11;p12).

Când un cromozom apare a fi mai lung sau mai scurt decât omologul său, dar originea și sediul defectelor nu pot fi precizate, modificarea este specificată prin plasarea semnelor „+" sau „—" după simbolul brațului cromozomial afectat. Astfel, 14q+ semnifică prezența unui material cromozomial adițional pe brațul lung al cromozomului 14, iar 5q— indică deleția brațului lung al cromozomului 5.

1.2.2.3. Alte modificări citogenetice întâlnite în celulele neoplazice

Izocromozomii, specificați prin simbolul „i", rezultă prin clivarea anormală, în plan transversal, a centromerilor în anafază, sau prin ruperea în regiunea paracentromerică a cromozomilor dicentrici. În prima diviziune celulară care urmează producerii lor, izocromozomii apar sub forma unor cromozomi perfect metacentrici, alcătuiți din două brațe identice în ce privește marcajul în benzi, dar în care ordinea benzilor este inversată (marcaj în oglindă). Relativ frecvenți în limfoproliferările maligne, izocromozomii par să confere avantaj selectiv celulelor purtătoare. Izocromozomul de brațe lungi 17 — i(17)(q) — figurează printre anomaliile întâlnite în faza blastică a leucemiei granulocitare cronice.

Cromozomii minusculi (CM) și regiunile omogen colorate (ROC) reprezintă manifestări alternative ale fenomenului de amplificare genică. CM se prezintă ca perechi de elemente cromatiniene mici, acentrice, iar ROC sunt vizualizate ca segmente cromozomiale interstițiale sau terminale, în care structura în benzi este foarte vagă sau lipsește complet, și care conduc la creșteri semnificative ale lungimii cromozomilor. Prezenți aproape constant în celulele care au dobândit rezistență multiplă la medicația citostatică, acești echivalenți citogenetici ai amplificării genice sunt observați doar ocazional în cancerele umane înainte de începerea chimioterapiei. Totuși, anumite tumori — în special neuroblastoamele — sunt purtătoare de CM sau ROC încă de la debutul clinic. Unele secvențe ADN a căror amplificare conduce la formarea de CM și ROC au fost de-

monstrate a fi protooncogene iar creşterea numărului de cópii ale unei protooncogene reprezintă unul dintre mecanismele răspunzătoare de iniţierea şi progresiunea neoplasmelor.

1.3. CARACTERUL CLONAL AL ABERAŢIILOR CROMOZOMIALE DIN NEOPLASMELE UMANE

Începutul anilor '60 a înregistrat un succes remarcabil al citogeneticii: identificarea primului marker cromozomial al unei neoplazii maligne — cromozomul Ph^1, dovedit a fi prezent în aproape toate cazurile de leucemie granulocitară cronică. Entuziasmului iniţial generat de această descoperire i-a luat însă locul o atitudine sceptică şi rezervată deoarece — în pofida numărului mare de investigaţii — citogeneticienii nu au mai reuşit să evidenţieze o altă aberaţie specifică unei anumite forme de cancer. Deşi prezente în multe dintre tumorile studiate, modificările cromozomiale au apărut a fi nesistematizate şi nerepetabile. Ca atare, timp de 10 ani conceptul dominant a fost acela al variabilităţii extreme a cariotipului celulelor maligne. Ca un corolar firesc, aberaţiile cromozomiale au fost interpretate ca reprezentând fenomene secundare, neimplicate esenţial în procesul transformării maligne.

Abandonarea completă a acestei concepţii s-a produs în anii '70 şi a fost impusă de datele obţinute prin utilizarea metodologiilor de inducere a modelelor de benzi. Analizele citogenetice efectuate în hemopatiile maligne au demonstrat fără echivoc că: a) prezenţa aberaţiilor cromozomiale clonale (derivate dintr-o singură celulă) constituie o regulă şi nu o excepţie; b) aberaţiile au un caracter strict neîntâmplător (anumiţi cromozomi şi anumite regiuni cromozomiale sunt preferenţial implicaţi în geneza aberaţiilor); c) asocierile dintre unele configuraţii cariotipice anormale şi subtipul morfoclinic de boală sunt atât de strânse încât aberaţia respectivă poate fi considerată ca patognomonică.

Dificultăţile de ordin tehnic în obţinerea preparatelor cromozomiale din tumorile solide au făcut ca volumul datelor despre profilurile cariotipice ale acestor tumori să fie mult mai redus comparativ cu cel al datelor despre anomaliile cromozomiale din hemopatiile maligne (din totalul cazurilor de neoplazii caracterizate prin prezenţa de anomalii clonale, tumorile solide reprezintă mai puţin de 25%).

Dificultăţile, generate în principal de rata redusă a proliferării *in vitro* a celulelor canceroase şi de calitatea slabă a preparatelor cromozomiale, sunt în prezent în mare măsură depăşite, ca urmare a perfecţionării metodelor de dezagregare a tumorilor şi de cultivare a celulelor *in vitro*, şi mai ales a utilizării tehnicilor de sincronizare a creşterii celulare.

Informaţiile recente converg în a demonstra că între aspectele citogenetice ale tumorilor solide şi cele ale hemopatiilor maligne nu există diferenţe fundamentale.

Astfel, s-a stabilit că în celulele a cel puţin 50% din tumorile solide sunt prezente anomalii cromozomiale clonale a căror distribuţie în genom este neîntâmplătoare. De cele mai multe ori aceste aberaţii sunt specific asociate cu tipul tumorii, dar există şi situaţii în care o anumită aberaţie este comună unor tipuri diferite de proliferări neoplazice.

1.3.1. ANOMALIILE CLONALE SUNT PREZENTE ŞI ÎN NEOPLAZIILE BENIGNE

Un interes special a suscitat constatarea că anomaliile cromozomiale clonale nu sunt apanajul exclusiv al tumorilor maligne; deşi cu o frecvenţă mai redusă, aberaţiile clonale sunt întâlnite şi în neoplaziile benigne (vezi 1.8.1). Fibroamele uterine, tumorile benigne ovariene, hiperplaziile şi adenoamele tiroidiene, adenofibroamele mamare şi multe alte creşteri inocente ca, de exemplu, plăcile ateromatoase manifestă frecvent trisomii şi aberaţii care indică evoluţia clonală. Rezultă că, din punct de vedere citogenetic, este operaţional ca delimitarea să se facă nu între tumorile maligne şi tumorile benigne, ci între celulele neoplazice şi cele nonneoplazice. Prezenţa anomaliilor clonale devine, aşadar, un element important în caracterizarea unui proces patologic ca fiind de natură neoplazică şi atrage, totodată, atenţia asupra riscului potenţial de malignizare.

1.3.2. EXISTĂ TUMORI ÎN CARE ANOMALIILE CROMOZOMIALE NU SUNT DECELABILE

În etapa actuală, analiza citogenetică nu reuşeşte să detecteze anomalii cromozomiale clonale în toate tumorile examinate. Celulele unei tumori pot să apară citogenetic normale chiar dacă tumora respectivă aparţine unui tip histologic cunoscut a se asocia frecvent cu o anumită aberaţie cromozomială.

Două sunt explicaţiile posibile ale acestei aparente abateri de la teoria mutaţiei somatice în cancerogeneză:

a) Analiza citogenetică a surprins numai diviziuni ale celulelor stromale care, obişnuit, se multiplică *in vitro* mai activ decât celulele tumorale. Această supoziţie este dificil de testat deoarece, prin prelucrarea în vederea obţinerii preparatelor cromozomiale, trăsăturile fenotipice care diferenţiază celulele stromei de cele ale parenchimului tumoral dispar, celulele pierzându-şi astfel identitatea.

Recent a fost imaginată o metodă care permite analiza simultană, pe o aceeaşi celulă, a modificărilor cromozomiale din nucleul interfazic — relevate prin hibridizare *in situ* —, a morfologiei celulare şi a markerilor de suprafaţă. Rezultatele obţinute demonstrează că proporţia tumorilor cariotipic anormale este mai mare decât cea evaluată prin tehnicile citogenetice curente.

Hibridizarea *in situ* a nucleilor interfazici cu probe specifice diferiţilor cromozomi ai complementului (citogenetica interfazei) se anunţă a fi o metodă de mare acurateţe care elimină riscurile de eroare decurgând din artefactele şi limitările inerente tehnicilor convenţionale (metafaze calitativ inadecvate, pierderi potenţiale de material cromozomial, selecţia *in vitro* a unor linii celulare).

În aceeaşi ordine de idei trebuie menţionat şi faptul că eşantionul supus analizei citogenetice cuprinde cel mult 10^{-10} din totalul celulelor tumorale, iar examinarea a 10 sau chiar 100 de celule în diviziune nu poate garanta reprezentativitatea observaţiilor.

b) Aberațiile cromozomiale sunt prezente dar dimensiunile lor se situează sub limita puterii de rezoluție a tehnicilor microscopice. În complementul haploid uman sunt evidențiate uzual 330 de benzi. Fiecare bandă conține între 0,5 și 1×10^7 perechi de nucleotide, ceea ce corespunde la aproximativ 50—100 de gene. Alterările unor segmente ADN cu o lungime inferioară unei benzi, deși extensive în termenii geneticii moleculare, sunt prea mici pentru a fi vizualizate la microscopul optic și, ca atare, celula care le poartă va fi considerată citogenetic normală.

Surprinzător este că în rearanjările genomice din celulele canceroase sunt implicate segmente ADN atât de lungi încât alterările consecutive ale morfologiei cromozomilor pot fi sesizate microscopic în peste 50% din tumori.

1.3.3. SEMNIFICAȚIA ETIOPATOGENICĂ A ABERAȚIILOR CROMOZOMIALE DIN CANCERE

Tabloul citogenetic al tumorilor solide este, în general, mai complex decât cel al hemopatiilor maligne. Aberațiile sunt adeseori masive, astfel încât identificarea cromozomilor sau a regiunilor cromozomiale care participă la rearanjarea structurală este dificilă sau chiar imposibilă. În scopul evaluării importanței și a rolului anomaliilor cromozomiale în etiopatogenia proceselor neoplazice, alterările cariotipice au fost clasificate în trei categorii.

A. Anomalii primare: sunt reprezentate de leziuni solitare, detectabile din cele mai timpurii faze ale bolii; apar a fi puternic corelate cu tipul tumorii și li se atribuie un rol esențial în inițierea procesului malign.

B. Anomalii secundare: apar pe parcursul dezvoltării tumorii ca o consecință a instabilității genomice caracteristică celulelor neoplazice. Valoarea diagnostică a acestor modificări este redusă. Ele generează variabilitatea genetică și fenotipică specifică populațiilor celulare tumorale și asigură astfel substratul pentru acțiunea selecției naturale. Prin definiție, anomaliile secundare nu pot fi solitare. Totuși, în eventualitatea în care modificarea genetică primară este submicroscopică, aberația secundară poate fi eronat interpretată ca fiind una solitară și, ca urmare, poate fi asociată — de asemenea eronat — unei forme histologice specifice. O astfel de asociere are o probabilitate minimă de repetare și este, totodată, lipsită de semnificație biologică și clinică.

C. „Zgomotul citogenetic": este reprezentat de tablouri cariotipice bizare, necoerente, haotice, conținând multe aberații structurale și numerice neclonale. Se datorează instabilității genetice a populațiilor celulare tumorale și caracterizează fazele avansate ale bolii canceroase. Ele generează diversitate, dar este improbabil să confere avantaj proliferativ; dimpotrivă, unele pot fi chiar incompatibile cu viața celulei purtătoare.

1.4. CONCEPTUL DE INSTABILITATE CROMOZOMIALĂ

Stabilitatea genetică, condiție esențială pentru desfășurarea normală a activităților celulare, este menținută prin intervenția unor mecanisme complexe care asigură:

1) Păstrarea integrității structurale și funcționale a ADN prin a) prevenirea producerii de erori în cursul proceselor de replicare și recombinare, b) corectarea erorilor produse accidental sau ca urmare a acțiunii unor agenți din mediul intern sau extern, c) protecția față de acțiunea injuriantă a unor produși ai metabolismului celular (radicali liberi etc.);

2) Segregarea riguros exactă a cromozomilor în cursul diviziunii celulare.

Aceste mecanisme se află sub controlul unor agregate genice multiple care funcționează separat sau concertat în vederea păstrării echilibrului ecogenetic dintre tendința inerentă la destabilizare genetică și activitatea sistemelor stabilizatoare.

Este suficient ca doar una dintre zecile sau poate chiar sutele de gene colectiv numite „de stabilizare" să sufere o alterare a funcției sale pentru ca echilibrul ecogenetic să fie perturbat, consecutiv instalându-se starea de instabilitate genetică.

Dacă gena defectivă este implicată în menținerea integrității cromozomilor sau în controlul diviziunii celulare, consecința va fi apariția instabilității cromozomiale, exprimată printr-o incidență crescută a rupturilor și rearanjărilor aberante și, respectiv, prin anomalii cromozomiale numerice.

Instabilitatea cromozomială poate fi constituțională sau dobândită.

Instabilitatea constituțională este dramatic ilustrată de așa-numitele sindroame „de rupere cromozomială". Aceste afecțiuni — sindromul Bloom, ataxia-telangiectazia, anemia Fanconi — sunt determinate monogenic, se transmit recesiv autozomal și au în comun: tabloul citogenetic dominat de prezența unor leziuni cromozomiale nesistematizate, defectele reparării ADN și predispoziția marcată la dezvoltarea neoplaziilor maligne (vezi tabelul 2.2).

În sindromul Bloom tabloul citogenetic este caracteristic: rearanjările de tip cromatidian realizate între cromozomi omologi conduc la apariția unor configurații cvadriradiale; frecvența schimburilor dintre cromatidele surori (SCS) este de câteva ori mai înaltă decât la normali; 25% dintre bolnavi fac leucemii acute limfoblastice (LAL) și nelimfocitare (LANL), limfoame nehodgkiniene (LNH) sau diferite carcinoame. Cauza biochimică a instabilității cromozomiale o constituie activitatea redusă a ligazei I.

In anemia Fanconi prevalente sunt rupturile cromatidiene și rearanjările între cromozomi neomologi; incidența SCS nu este crescută; neoplasmele mai frecvente sunt LANL, tumorile hepatice și carcinoamele pielii. Defectul biochimic nu a fost stabilit cu certitudine, dar se pare că rezidă într-o alterare a metabolismului oxigenului.

Ataxia-telangiectazia este o afecțiune în care instabilitatea cromozomială se traduce prin rupturi cromatidiene și cromozomiale, dar și prin translocații clonale care implică cromozomii 7 și 14; incidența SCS este

normală; aproximativ 10% dintre bolnavi dezvoltă diferite forme de cancer care, în ordinea descrescândă a frecvenței sunt: LNH, LAL, carcinoame și limfoame Hodgkin; defectul biochimic a fost identificat recent.

Xeroderma pigmentosum diferă de sindroamele de mai sus prin faptul că rata ruperii cromozomiale spontane este normală. Instabilitatea cromozomială poate fi însă revelată prin iradierea cu ultraviolete a celulelor cultivate *in vitro*, situație în care incidența rupturilor și a SCS prezintă creșteri anormale. Aproape toți bolnavii sunt purtători, încă din copilărie sau adolescență, ai unor tumori benigne sau maligne ale pielii: angioame, fibroame, keratoacantoame, carcinoame spino- și bazocelulare, melanoame maligne sau sarcoame. Enzima defectivă este endonucleaza.

Instabilitatea cromozomială constituțională a fost descrisă și în alte sindroame recesiv autozomale, în care ruperea cromozomială se asociază cu proliferări maligne. Bolnavii cu sindrom Werner prezintă frecvent aberații structurale multiple cu caracter clonal; la aproximativ 10% din bolnavi se înregistrează sarcoame și meningioame. În aceeași categorie de boli au fost incluse și sindroamele Nijmegen, Chediak—Hijashi și Rothmund—Thomson.

Sunt cunoscute însă și boli genetice recesiv autozomale în care instabilitatea cromozomială nu se asociază cu un risc crescut de apariție a cancerului: sindromul Cockayne și progeria.

S-a afirmat că instabilitatea cromozomială ar putea constitui un marker al predispoziției genetice la cancer. Evidențierea unei instabilități latente se poate realiza expunând celule cultivate *in vitro* (limfocite periferice, fibroblaști) la agenți cromozomoclazici (care produc rupturi cromozomiale). Compararea răspunsurilor citogenetice ale subiecților presupuși a avea o predispoziție constituțională la cancere cu răspunsurile înregistrate la martori permite evaluarea gradului de instabilitate cromozomială.

O rată semnificativ crescută a ruperii cromozomiale indusă de agenți cromozomoclazici a fost notată la pacienții cu polipoză adenomatoasă familială, boală cu transmitere autozomal dominantă și cu risc total de malignizare.

Răspunsuri citogenetice anormale au fost înregistrate și în alte afecțiuni transmise autozomal dominant: sindromul neoplaziilor endocrine multiple, tipul II, sindromul nervilor displazici și porokeratoza Mibelli.

În schimb, celulele bolnavilor cu retinoblastom, forma ereditară, care se transmite de asemenea după modul dominant autozomal, au prezentat, în toate cazurile studiate, rate normale ale ruperii cromozomiale.

Rezultatele cercetărilor întreprinse în familiile în care predispoziția la cancere apare a fi determinată multifactorial, ca și rezultatele înregistrate la bolnavii cu tumori sporadice nu sunt de natură să indice existența unei instabilități cromozomiale constituționale.

Instabilitatea cromozomială dobândită este rezultatul mutațiilor care se produc la nivelul genelor de stabilitate. Parte integrantă a mecanismelor prin care se realizează progresiunea tumorilor, instabilitatea cromozomială dobândită asigură apariția neîncetată de noi variante cariotipice anormale. Asupra acestora acționează selecția naturală, reținând combinațiile genice care conferă celulelor autonomie a creșterii, avantaj proliferativ și capacitate de metastazare (vezi Capitolul 2).

1.4.1. SCURTAREA TELOMERELOR GENEREAZĂ INSTABILITATE CROMOZOMIALĂ

Telomerele îndeplinesc roluri structurale şi funcţionale importante: a) asigură stabilitatea cromozomilor şi ataşarea lor la învelişul nuclear; b) împiedică interacţiunea cu regiunile interne ale altor cromozomi şi fuzionarea cu alte telomere.

Regiunile terminale ale cromozomilor — telomerele — sunt alcătuite din secvenţe ADN simple (hexamerul TTAGGG), repetate în tandem de 800—3 000 de ori, realizând o lungime de 5—15 kilobaze. Secvenţelor nucleotidice li se asociază proteine specifice care le protejează de atacul nucleazelor.

La fiecare rundă de replicare *in vitro* a ADN din celulele somatice telomerele pierd, în medie, 75 de perechi nucleotidice. Lungimea telomerelor se reduce progresiv, în paralel cu înaintarea în vârstă şi cu numărul diviziunilor celulare.

Scurtarea fiziologică a telomerelor este privită ca un mecanism posibil al senescenţei *in vivo* şi *in vitro;* i se atribuie, de asemenea, un rol semnificativ în progresiunea tumorilor.

Este cunoscut că numărul diviziunilor *in vitro* ale celulelor somatice normale este limitat (limita Hayflick) şi că această limită depinde de specie şi de vârsta donorului. În cazul fibroblaştilor umani limita este atinsă după 50—80 de dublări. Fenomenul a fost corelat cu scurtarea progresivă a telomerelor: când lungimea telomerelor atinge o valoare critică (aproximativ 1,5 kilobaze), celulele părăsesc ciclul celular, îşi sistează definitiv multiplicarea, după care mor prin apoptoză. Cromozomii celulelor din culturile senescente prezintă frecvent numeroase asocieri telomerice care conduc la formarea de configuraţii dicentrice şi inelare.

Aceste tipuri de aberaţii pot fi observate şi în unele tumori maligne, apariţia lor fiind o consecinţă directă a scurtării telomerelor care, devenind adezive, creează condiţii pentru fuzionarea capetelor cromozomiale.

În celulele tumorale, spre deosebire de cele normale, prezenţa asocierilor telomerice nu anticipează obligatoriu apoptoza ci, dimpotrivă, favorizează emergenţa unor variante cariotipice cu agresivitate sporită.

1.5. SITUSURILE FRAGILE — BIOMARKERI AI PREDISPOZIŢIEI GENETICE LA CANCER

Situsurile fragile (SF) transmisibile ereditar sunt zone cromozomiale caracterizate prin următoarele trăsături: a) se prezintă citologic sub forma unor lacune necolorabile sau a unor discontinuităţi ale filamentelor cromozomiale care interesează, de regulă, ambele cromatide surori; b) amplasarea pe cromozomi a zonelor fragile este specifică şi invariabilă; c) transmiterea la descendenţi se face după modul mendelian codominant cu penetranţă completă; d) fragilitatea se exprimă prin producerea de fragmente acentrice, cromozomi deletaţi şi configuraţii triradiale.

Până în prezent au fost identificate peste 30 de SF transmisibile ereditar. Exprimarea acestor SF reclamă condiţii speciale de cultivare a celulelor şi este indusă specific de anumiţi agenţi: unele SF sunt sensi-

bile la antagonişti ai acidului folic şi la inhibitori ai timidilat-sintetazei, altele — la distamicină A, bromodezoxiuridină, netropină, interferon etc.

Frecvenţa SF transmisibile ereditar este redusă: doar 0,2—0,5% din indivizi sunt purtători ai unuia sau mai multor SF.

Pe lângă aceste SF rare, pe cromozomi au mai fost descrise şi alte zone cu fragilitate crescută, şi care constituie ţinta preferenţială a acţiunii agenţilor cromozomoclazici ambientali. Numărul acestor puncte de maximă susceptibilitate la rupere depăşeşte cifra de 100, iar frecvenţa lor în populaţie este înaltă, motiv pentru care au primit denumirea de SF comune.

Unul dintre SF transmisibile ereditar — şi anume cel situat pe braţul lung al cromozomului X în poziţia q27.3 (fra(X)(q27.3) — este răspunzător de producerea anomaliilor fenotipice care definesc sindromul X fragil (caracterizat la bărbaţi prin întârziere mentală, macroorhidie şi displazie a ţesutului conjunctiv).

Ocazional au fost raportate şi alte asocieri între SF şi unele malformaţii congenitale dar afirmarea relaţiei de cauzalitate este, încă, lipsită de suportul statistic corespunzător.

Semnificaţia patologică majoră a SF rezidă însă în faptul — larg acceptat — că aceste alterări ale structurii cromozomilor sunt generatoare ale unui risc notabil de dezvoltare a neoplaziilor maligne. Explicaţia acestui fenomen este fundamentată pe următoarele observaţii: a) localizarea pe cromozomi a unora dintre punctele de rupere implicate în formarea rearanjărilor neîntâmplătoare din cancere coincide cu sediul unor SF; b) la nivelul unor SF, sau în imediata lor vecinătate, se află oncogene sau gene supresoare ale creşterii tumorale (antioncogene); c) la bolnavii cu unele forme de cancere, precum şi la rudele acestora, frecvenţa exprimării unor SF rare este mai înaltă decât în populaţia generală.

Pe baza acestor date se poate imagina un scenariu al malignizării în care rolul principal revine situsurilor fragile:

— spontan, sau sub acţiunea carcinogenilor din mediu, un filament cromozomial se rupe în zona de minimă rezistenţă reprezentată de un situs fragil;

— în situaţia în care capetele rupte nu se reunesc, segmentul distal se elimină;

— dacă în acest segment este localizată o antioncogenă a cărei corespondentă de pe cromozomul omolog fusese anterior inactivată printr-o mutaţie, rezultă aşa-numita stare de pierdere a heterozigozităţii: celula deprivată de ambele antioncogene scapă de sub controlul mecanismelor care asigură homeostazia proliferării şi se transformă într-o celulă neoplazică.

Un scenariu asemănător se aplică şi situaţiei în care filamentele cromozomiale suferă rupturi multiple:

— dacă una dintre rupturi interesează un SF la nivelul căruia se află o protooncogenă, reunirea ilegitimă a capetelor rupte se poate solda cu: a) plasarea protooncogenei în juxtapoziţie cu elementele reglatoare (promotori, intensificatori) ale unei gene transcripţional active; b) fuzionarea protooncogenei cu o genă, de asemenea, transcripţional activă. În prima variantă, rezultatul este dereglarea transcripţională a protooncogenei (supraexprimarea), iar în a doua — sinteza unei oncoproteine himerice. În ambele variante, consecinţa este aceeaşi: producerea unui eveniment esenţial pentru iniţierea sau progresiunea neoplaziilor.

1.6. CONCEPTUL DE EVOLUȚIE CARIOTIPICĂ

Tumorigeneza este un proces evolutiv complex care a) începe prin transformarea celulei normale în una neoplazică, b) se continuă prin parcurgerea unor etape obligatorii, în care celulei neoplazice i se imprimă secvențial trăsăturile malignității și c) culmină cu emergența clonei canceroase.

Altfel spus: exprimarea plenară a fenotipului malign, definit nu numai prin capacitatea creșterii autonome, ci și prin invazivitate și capacitate de metastazare, este rezultatul unui proces multistadial la sfârșitul căruia, consecutiv acumulării progresive a unor modificări genetice și acțiunii unor factori epigenetici, celula apare dotată cu toate atributele malignității.

Concepția curentă despre caracterul multistadial al bolii canceroase este fundamentată pe un amplu corp de date experimentale, morfoclinice, genetice și epidemiologice (expuse în capitolul 2), cărora li se adaugă puternicele argumente pe care le furnizează citogenetica.

În acest subcapitol este prezentat scenariul — deosebit de sugestiv — al evenimentelor citogenetice care se succed în cursul evoluției biologice și clinice a leucemiei mieloide cronice (LGC).

Potrivit acestui scenariu, evoluția LGC comportă parcurgerea a trei etape, fiecare din acestea fiind marcată prin achiziția unor anomalii genetice. Criza blastică se declanșează atunci când în celula leucemică s-a acumulat un anumit număr de defecte; ordinea acumulării poate să difere; importantă este asocierea anomaliilor în combinații apte să sporească potențialul malign al celulei purtătoare.

Cromozomul Ph[1], rezultat al translocației 9;22(q34;q11) (figura 1.2), este prezent încă de la debutul clinic la peste 90% din bolnavii cu LGC și rămâne, pe tot parcursul fazei cronice, singura anomalie cromozomială detectabilă. La 75—80% din bolnavi, tranziția la faza acută este precedată de apariția unor modificări cariotipice adiționale, la a căror realizare poate participa oricare din cei 46 de cromozomi ai complementului. Totuși, în marea majoritate a cazurilor, aceste modificări au un caracter neîntâmplător, interesând în mod preferențial cromozomii 8, 17, 22, 19, 21. Cromozomul adițional 8, un al doilea Ph[1] și izocromozomul 17 de brațe lungi apar cu frecvența cea mai înaltă. Adiția de cromozomi 19 și 21 este mai puțin frecventă și se produce în faze mai avansate ale

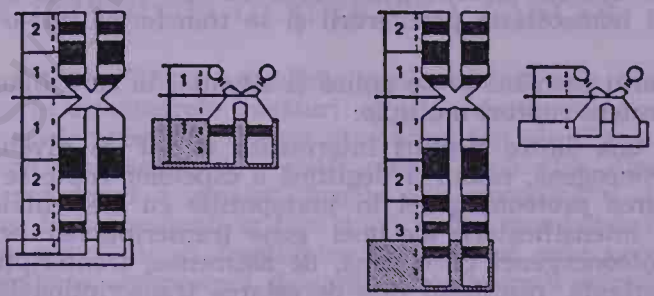


Fig. 1.2. Translocația t (9; 22) din LGC.

bolii. Pe măsură ce boala avansează, în celulele leucemice apar noi anomalii citogenetice. Asocierea anomaliilor într-o aceeaşi celulă este, de asemenea, neîntâmplătoare.

Evoluţia cariotipică se poate realiza pe mai multe căi, dintre care una — cea principală — comportă participarea neîntâmplătoare, preferenţială, a cromozomilor 8, 17, 19 şi 22. Aceasta este calea aleasă în 70% din cazuri, motiv pentru care a fost denumită ruta majoră. Celelalte căi — rutele minore — realizează secvenţe de tablouri citogenetice mai puţin coerente, şi a căror recurenţă este redusă.

Nu există nici un dubiu cu privire la importanţa crucială a translocaţiei 9;22 în patogenia LGC. Deşi nedetectabilă citologic, această translocaţie este, totuşi, prezentă şi la bolnavii Ph^1 negativi; tehnicile geneticii moleculare evidenţiază la aceşti bolnavi rearanjări submicroscopice ale cromozomilor 9 şi 22 prin care se realizează echivalenţii patogenici ai cromozomului Ph^1, indispensabili pentru progresiunea LGC.

Persistă, în schimb, incertitudini în legătură cu rolul care se atribuie translocaţiei 9;22 în iniţierea procesului leucemogen. O serie de date experimentale sugerează că formarea cromozomului Ph^1 este precedată de constituirea unei clone de celule stem multipotente, capabile să se sustragă acţiunii mecanismelor de control negativ al proliferării. În acelaşi sens argumentează şi observaţiile potrivit cărora, la unii bolnavi cu LGC, apariţia cromozomului Ph^1 este ulterioară debutului clinic şi hematologic.

Pe de altă parte, studiile efectuate pe şoareci transgenici şi pe şoareci inoculaţi cu un retrovirus purtător al genei hibride abl/bcr (vezi capitolul 2) par să demonstreze fără nici un echivoc rolul translocaţiei 9;22 în iniţierea procesului leucemic.

Datele prezentate în acest paragraf relevă că dinamica aspectelor citogenetice în LGC se conformează unui model de evoluţie stadială.

În situaţia în care translocaţia 9;22 este creditată doar cu rolul patogenic, modelul este următorul:

— într-un prim stadiu are loc proliferarea clonală a unor celule stem multipotente, Ph^1 negative, genetic instabile, dotate cu avantaj selectiv; cauza individualizării acestei clone este necunoscută;

— în stadiul al doilea are loc formarea, în una dintre celulele clonei premaligne, a translocaţiei 9;22, care rearanjează protooncogena c-abl, dereglându-i activitatea funcţională: apare clona Ph^1 pozitivă;

— al treilea stadiu este reprezentat de criza blastică; creşterea instabilităţii genetice creează condiţii pentru formarea anomaliilor cromozomiale adiţionale care sporesc potenţialul malign al clonei leucemice. Apar, probabil, clone colaterale multiple, selecţia reţinându-le pe cele mai agresive care, în scurt timp, devin majoritare.

În situaţia în care translocaţia 9;22 este privită ca eveniment primar, modelul se ajustează corespunzător.

Etapele procesului leucemogen corespund celor identificate în studiile de tumorogeneză experimentală, şi sunt, neîndoielnic, aceleaşi cu etapele care caracterizează evoluţia oricărui cancer: iniţierea, promovarea şi progresiunea. De altfel, toate datele citogenetice obţinute până în prezent prin investigarea seriată a cancerelor umane se adecvează unor modele multistadiale. Cel mai ilustrativ şi, totodată, cel mai bine documentat, rămâne, totuşi, modelul LGC, datorită, în primul rând, particularităţilor evolutive ale acestei boli, care fac posibilă urmărirea în dinamică a aspectelor citogenetice.

In încheiere, mai trebuie menţionat faptul că, în cazul tumorilor umane, intervalele de timp care separă evenimentele răspunzătoare de tranziţia de la un stadiu la altul sunt foarte lungi, de ordinul anilor. Astfel, în LGC durata fazei de iniţiere este de 8 ani, iar cea a fazei de promovare — de 3—4 ani.

1.7. ASPECTELE CITOGENETICE ALE HEMOLIMFOPROLIFERĂRILOR MALIGNE

1.7.1. BOLI MIELOPROLIFERATIVE

1.7.1.1. Leucemiile acute nelimfocitare (LANL)

Analiza observaţiilor citogenetice efectuate în LANL evidenţiază trăsături comune tuturor subtipurilor morfoclinice în ce priveşte frecvenţa, evoluţia şi semnificaţia modificărilor cariotipice.

Frecvenţa: anomaliile cromozomiale clonale sunt prezente la 70—90% din bolnavi (procentul depinzând, în mare măsură, de experienţa investigatorului şi de metoda utilizată). În ultimii 10—15 ani proporţia rezultatelor pozitive s-a dublat ca urmare a utilizării tehnicilor de sincronizare celulară care măresc substanţial puterea de rezoluţie a analizei cromozomiale. Este de aşteptat ca, prin aplicarea tehnicilor foarte recente ale citogeneticii interfazei, proporţia rezultatelor pozitive să tindă către unitate. S-a afirmat, de altfel, că anomaliile cromozomiale sunt virtual prezente la toţi bolnavii cu LANL; bolnavii cu cariotipuri exclusiv normale ar fi, de fapt, purtători ai unor anomalii oculte (deviaţii minime).

La marea majoritate a bolnavilor, alături de clonele cu anomalii cromozomiale, există şi celule cu cariotip normal. Raportul între celulele anormale şi cele normale pare a fi cu atât mai înalt cu cât celula de origine a clonei leucemice este mai puţin diferenţiată.

Evoluţia: anomaliile cromozomiale observate la debutul bolii dispar în remisiunile complete; cu puţin timp înainte de producerea recăderilor, anomaliile reapar, singure sau însoţite de alte modificări cariotipice.

Semnificaţia: unele anomalii din LANL anunţă evoluţii severe şi rapide. Valoarea de indicator al duratei de supravieţuire a diminuat ca urmare a eficientizării tratamentelor. Identificarea la un bolnav a unor astfel de anomalii rămâne, totuşi, utilă pentru alegerea conduitei terapeutice. Datorită asocierii lor constante şi specifice cu anumite subtipuri morfoclinice, unora dintre anomaliile cromozomiale li se atribuie calitatea de criteriu complementar de clasificare a leucemiilor acute.

LAM M-2

Peste 15% din adulţii cu LAM M-2 prezintă în blaştii leucemici translocaţia t(8:21)(q22:q22). În cazurile pediatrice frecvenţa acestei translocaţii depăşeşte 30%. Blaştii purtători ai t(8;21) au nucleii uşor indentaţi, citoplasma bazofilă, frecvenţi corpi Auer şi nucleoli proeminenţi. Remisiunea completă se obţine în 90% din cazuri, iar supravieţuirea medie la adulţi este de 2 ani. După 5 ani de la diagnostic se mai află

în viață 23% din adulți și 48% din copii. La 85% din bolnavii de sex masculin t(8;21) se asociază cu pierderi ale cromozomului Y, iar 67% din femei prezintă monosomie X. Translocația t(8;21) se poate asocia și cu alte anomalii cromozomiale, îndeosebi +8 și aberații structurale 7q, dar acestea nu influențează semnificativ prognosticul. La nivelul punctului de rupere de pe cromozomul 21 este situată gena AML1, iar la nivelul 8q22 — gena ETO. Funcțiile produșilor proteici ai acestor gene nu sunt cunoscute; formarea transcriptului himeric AML1/ETO pare să constituie evenimentul critic în transformarea leucemică.

LAM-M3

Translocația t(15;17)(q22—24;q11—21) (figura 1.3) este cea mai specifică dintre toate anomaliile cromozomiale întâlnite în bolile maligne hematologice. Ea se asociază exclusiv cu LAM-M3 și este prezentă la aproape 100% din bolnavi. În cele câteva cazuri de LGC raportate în literatură, în care criza blastică a avut un aspect promielocitar, t(9;22) a fost invariabil asociată cu t(15;17), ceea ce dovedește implicarea specifică a acestei translocații în proliferarea promielocitelor. Genele izolate de la nivelul punctelor de rupere sunt PML (promyelocytic leukemia) pe cromozomul 15 și RARA (retinoic acid receptor alpha) pe cromozomul 17. Proteina hibridă codificată de gena de fuziune PML/RARA de pe cromozomul 15 inhibă diferențierea normală, dar în prezența unui exces de acid retinoic exercită efecte contrare, tratamentul cu derivați ai acidului retinoic conducând la remisiuni complete în 80% până la 90% din cazuri. La bolnavii cu LAM-M3 citogenetic normali, tehnica „Southern blot" decelează întotdeauna rearanjări moleculare 15;17. În cadrul LAM-M3 s-a descris o variantă hipogranulară asociată cu procese de coagulare intravasculară diseminată. Varianta a fost identificată pe baza trăsăturilor clinice și, mai ales, prin prezența t(15;17). Este foarte important ca diagnosticul corect să fie stabilit cât mai precoce deoarece terapia inițială trebuie să includă heparină pentru ca tulburările coagulării — complicații redutabile ale acestei forme — să poată fi jugulate. Diagnosticul morfologic al formelor tipice de LAM-M3 nu ridică probleme; în schimb, varianta în care granulațiile sunt reduse sau lipsesc poate să creeze confuzii; clarificarea este adusă de examenul citogenetic care relevă prezența t(15;17).

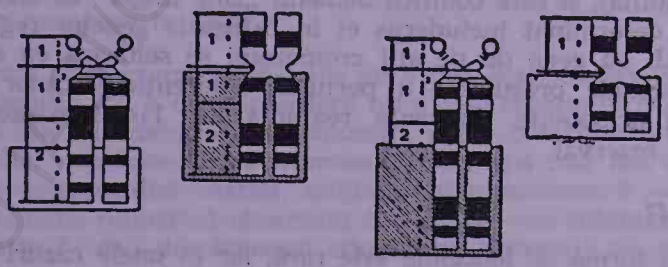


Fig. 1.3. Translocația (15; 17), prezentă în LAM-M3.

LAM-M4 eos

Prezența anomaliilor structurale ale cromozomului 16 în LAM-M4 cu eozinofile anormale reprezintă o altă asociere clinico-citogenetică, însă gradul ei de specificitate este mai redus. Anomaliile cromozomului 16 apar sub mai multe forme: inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22), del (16)(q22). Măduva hematogenă a bolnavilor cu aceste anomalii prezintă un exces de eozinofile (8—54%) ai căror precursori conțin granulații mari, neregulate, bazofile și granule anormale colorabile cu cloroacetat-esterază și acid periodic Schiff. Tipul aberațiilor se corelează cu aspectele morfologice ale blaștilor leucemici și cu evoluția bolii. În general, bolnavii cu LAM-M4 eos asociate cu aberații ale cromozomului 16 au prognostic mai bun decât cei la care cromozomul 16 apare citogenetic normal (remisiuni complete — 78% comparativ cu 36%; supraviețuire medie 65 de săptămâni față de 29 de săptămâni). Deleția brațului lung al cromozomului 16 reprezintă, totuși, un element negativ de prognostic. La aproximativ 50% din pacienți alterările structurale ale cromozomului 16 sunt însoțite de alte anomalii: +8, +21, +22, del(7q). Aberațiile structurale ale cromozomului 16 au fost notate și în sindroamele mielodisplazice, și chiar în unele boli limfoproliferative. La nivelul punctului de rupere 16p13 a fost identificată recent o genă — MYH2 — care codifică un polipeptid miozinic; implicațiile alterării acestei gene în leucemogeneză sunt încă obiectul unor speculații.

LAM-M5

La peste 75% dintre copiii sub un an și la 30% dintre adulții cu leucemii monoblastice analiza citogenetică evidențiază anomalii 11q23 (translocații, deleții interstițiale și terminale). Translocațiile care implică regiunea 11q23 sunt, în ordinea frecvenței, t(9;11)(p21—22;q23), t(11;19)(q23;p13), t(6;11)(q27;q23) și t(1;11)(q21;q23). Anomaliile 11q23 nu sunt specifice pentru LAM-M5: din totalul leucemiilor acute, atât mieloblastice cât și limfoblastice, 6% prezintă rearanjări ale regiunii 11q23; la copii, frecvența acestor anomalii este cu mult mai mare. Dintre translocațiile menționate, t(9;11) apare a fi cel mai strâns asociată cu LAM-M5 și cu leucemiile secundare dezvoltate la bolnavii tratați cu inhibitori ai topoizomerazei II (epipodofilotoxine). Studiile moleculare au izolat din regiunea 11q23 o genă cunoscută sub diferite denumiri: MLL (myeloid-lymphoid leukemia sau mixed-lineage leukemia), ALL (acute lymphoblastic leukemia), Htrxl sau HRX (datorită omologiei cu gena trithorax de la Drosofila), și care codifică domenii „zinc finger" de legare la ADN, ceea ce a determinat includerea ei în categoria genelor reglatoare. Fuziunea ALL cu gene de pe alți cromozomi se soldează cu sinteza unor proteine hibride prezumate a perturba diferențierea unor celule precursoare pluripotente. Prezența rearanjărilor 11q23 se asociază cu un prognostic rezervat.

LAM-M7

Această formă de leucemie este rară, iar în unele cazuri diagnosticul este dificil. Aberațiile la nivelul cromozomului 3q au o incidență crescută la bolnavii leucemici la care există anomalii ale megacariocitopoiezei. Rearanjările 3q nu sunt însă specifice pentru LAM-M7 și nu se corelează

întotdeauna cu modificări ale megacariocitelor. În schimb, în 67% din cazurile pediatrice de LAM-M7 este prezentă translocația t(1;22)(p13;q13), neîntâlnită în alte tipuri de neoplazii maligne sau la adulții cu leucemie megacariocitară. Prezența acestei translocații indică un prognostic sumbru.

LAM cu translocația t(6;9)(q23;q34)

Bolnavii cu această translocație reprezintă 2% din totalul cazurilor de LAM: marea lor majoritate prezintă creșteri ale numărului de bazofile medulare, acesta variind între 1,5 și 12% (valoarea normală — 0,2%); bazofilele apar a fi morfologic normale. Vârsta medie de debut al leucemiilor cu bazofilie este de 38 de ani, mai scăzută decât vârsta la care debutează, în general, leucemiile mieloblastice. Răspunsul la terapia de inducere a remisiunii este slab. De subliniat că punctul de rupere de pe cromozomul 9 se află în banda q34, implicată în formarea t(9;22) din LGC, afecțiune care se însoțește de creșteri numerice ale bazofilelor. Concluzia ar fi aceea că la nivelul regiunii 9q34 se află o genă care participă la reglarea proliferării bazofilelor. Studiile moleculare au stabilit că rezultatul rearanjării 6;9 este o genă hibridă formată prin fuziunea genelor DEK de pe cromozomul 6 și CAN, situată la 300 kbaze de gena ABL de pe cromozomul 9.

Alte aberații structurale recurente în LAM

Numeroase aberații primare, altele decât cele menționate, au fost ocazional înregistrate la bolnavii cu LAM (tabelul 1.1). Deși caracterul clonal și recurent al acestor anomalii este demonstrat, numărul redus de cazuri în care au fost semnalate face, pentru moment, dificilă corelarea lor cu particularitățile clinice și morfologice. Totuși, semnificația patogenică și prognostică a unora dintre translocațiile recurente a început să fie descifrată.

Translocația t(9;22)(q34;q11), întâlnită la 2—3% din bolnavii cu LAM (diferită însă de cea care caracterizează LGC în ce privește punctul de rupere de pe cromozomul 9) se asociază întotdeauna cu o evoluție rapidă.

Translocația t(8;16)(p11;p13) este prezentă în leucemia monocitară M5b (cu eritrofagocitoză).

Monosomiile parțiale 5q, 12p și 20q, mai frecvente în sindroamele mielodisplazice, sunt întâlnite și în LAM primare.

Modificări numerice în LAM

Cu excepția cromozomului 16, care nu a fost găsit niciodată în exces, și a cromozomului 12, a cărui pierdere nu a fost observată până în prezent, fiecare din autozomi și sexcromozomi poate contribui la generarea unei modificări numerice. Unii cromozomi participă mai des decât alții la realizarea aneuploidiei. Astfel, adiția unui cromozom 8 — cea mai frecventă anomalie numerică observată în LANL — se întâlnește ca aberație solitară la 5—6% din bolnavii citogenetic anormali; dacă la cei cu trisomie 8 se adaugă și bolnavii cu aberații adiționale, frecvența se dublează. Trisomia 21 este situată pe locul 2 în ordinea frecvenței anomaliilor numerice în LANL; deși a fost notată exclusiv în neoplaziile mie-

Tabelul 1.1

Principalele anomalii cromozomiale primare din leucemiile mieloide

Boala	Anomalia cromozomială	Procent bolnavi
LGC	t(9;22)(q34;q11)	100
LGC criza blastică	t(9;22)(q34;q11) cu +8, +Ph, +19, i(17q)	70
LAM M2	t(8;21)(q22;q23)	18
LAM M3	t(15;17)(q22;q11—12)	100
LAM M4 Eo	inv(16(p13;q22), t(16;16)(p13;q22)	100
LAM M4 și M5	t(1;11)(q21;q23)	
	t(2;11)(q21;q23)	
	t(6;11)(q27;q23)	
	t(10;11)(p11—15;q23)	35
	t(11;17)(q23;q25)	
	t(11;19)(q23;q13)	
	t(11;q13 sau q23), del(11)(q23)	
LAM M5	t(9;11)(q22;q23), t(11q13 sau q23)	30
LAM M6	del(20q)	8
LAM M7	t(1;22)(p12;q13)	10
LAM	+8	13
	—7 sau del(7q)	9
	—5 sau del(5q)	6
	t(6;9)(p23;q34)	2
	t(3;3)(q21;q26) sau inv(3)(q21q26)	2
	t(12p) sau del(12p)	2
	—7 sau del(7q) și/sau —5 sau del(5q)	90
LANL induse de chimioterapie	t(1;7)(p11;p11)	2
	t(3;21)(q26;q22)	1
	t(5;7)(q11;p11)	<1
	t(9;11)(p22;q23)	<1

LGC=leucemie mieloidă cronică; LAM=leucemie mieloblastică acută; LAM m4 eo=LAM M4 cu eozinofile anormale; LANL=leucemie acută nelimfocitară.

loide, nu s-a stabilit existența unei asocieri specifice cu un subtip de proliferare. Pierderi ale cromozomului 7 se notează la 8,5% dintre bolnavi, iar pierderea cromozomului 5 — la 5,6%. Adausurile sau pierderile altor autozomi sunt infrecvente ca anomalii solitare; de aceea sunt considerate a reprezenta evenimente secundare produse în cursul evoluției clonale.

Pierderea cromozomului Y în celulele măduvei hematogene este relativ comună la bărbații vârstnici și trebuie privită ca un fenomen normal care are loc în cadrul procesului de îmbătrânire. Această anomalie poate fi prezentă și în cazul unor neoplazii mieloide, de care pare a fi legată specific deoarece modificarea respectivă dispare în timpul remisiunilor și reapare în recăderi. Trisomia 4 se corelează cu displazia celulelor din toate seriile medulare observată în unele cazuri de LAM-M2 și LAM-M4, iar trisomia 22, specifică pentru LAM-M4 este incriminată a determina o reducere severă a eritropoiezei.

Niveluri crescute ale ploidiei (hipo- și hipertetraploidii) au fost notate mai ales în eritroleucemii.

1.7.1.2. Sindroamele mielodisplazice (SMD) primare

Sub denumirea de SMD sunt reunite entităţi morfoclinice care au în comun citopenia periferică şi hipercelularitatea măduvei hematogene, cu hematopoieză ineficientă în una sau mai multe linii celulare. Evoluţia spre leucemie acută se produce în 10 până la 35% din cazuri. În funcţie de morfologia celulară şi de proporţia blaştilor periferici şi medulari se descriu 5 subtipuri de SMD: anemia refractară (AR), AR cu sideroblaşti inelari, AR cu exces de blaşti (AREB), AREB în transformare şi leucemia cronică mielomonocitară. Modificările citogenetice, prezente la 70% din bolnavii cu SMD, sunt detectabile în celulele precursoare eritroide, mieloide şi megacariocitare, ceea ce dovedeşte că evenimentul iniţiator al neoplaziei se produce într-o celulă stem pluripotentă.

Cu excepţia t(8;21) şi t(15;17), toate celelalte aberaţii cromozomiale din LAM pot fi întâlnite şi în MDS. Nici una dintre aberaţii nu se corelează specific cu o anumită formă de SMD. Se apreciază că analiza citogenetică este în măsură să confirme diagnosticul şi să contribuie la evaluarea prognosticului în SMD. Bolnavii cu AR şi AR cu sideroblaşti inelari sunt, cel mai adesea, citogenetic normali, frecvenţa cariotipurilor anormale crescând în paralel cu creşterea numărului de blaşti. Aspectele morfologice sunt uneori insuficiente pentru diagnosticarea unei AR; evidenţierea, în această situaţie, a unei modificări cromozomiale este deosebit de utilă, permiţând identificarea unei linii celulare anormale. Pacienţii la care se decelează inaugural anomalii cromozomiale au un prognostic mai sever decât cei cu cariotipuri normale. Monitorizarea citogenetică a bolnavilor este importantă deoarece s-a arătat că: a) transformarea leucemică se produce la 25% din bolnavii fără aberaţii cromozomiale şi la 45% din cei care prezintă alterări ale tabloului citogenetic; b) dispariţia aberaţiilor constituie un indicator al eficienţei tratamentului. Cele mai frecvente aberaţii cromozomiale în SMD sunt: —5, del(5q), —7, del(7q), +8, +9, i(17q), +19, del(20q), +21, t(1;7)(p11;p11), t(1;3)(p36;q11), anomalii ale braţului lung al cromozomului X. Cazurile de SMD care prezintă ca singură anomalie cromozomială deleţia 5q au tabloul hematologic caracterizat prin anemie macrocitară, numere uşor crescute de trombocite şi hiperplazia megacariocitelor hipolobate. Aceste trăsături definesc sindromul 5q — care apare, în general, la femei vârstnice şi al cărui prognostic este favorabil.

O altă categorie de SMD definită citogenetic este sindromul monosomiei 7, caracterizat prin leucocitoză, anemie, trombocitopenie şi hipercelularitate medulară fără mielodisplazie semnificativă, la care se adaugă frecvent hepatosplenomegalie. Acest sindrom apare la copii, iar prognosticul este sumbru.

1.7.1.3. Sindroame mielodisplazice şi leucemii secundare

Bolnavii iradiaţi terapeutic, cei cărora li s-a administrat un tratament citostatic pentru o altă neoplazie, sau persoanele expuse profesional la agenţi genotoxici au un risc înalt de a dezvolta — într-un interval de 2—5 ani — sindroame mielodisplazice sau leucemii secundare cu caracter mieloblastic, şi ale căror profiluri cariotipice diferă de cele descrise în leucemiile primare. Prognosticul este infaust, iar proporţia cazurilor

cu anomalii cromozomiale este mare (peste 90%). Tabloul citogenetic este dominat de anomaliile cromozomilor 5 și 7: monosomie 5 în 11% din cazuri și del(5)(q31) în 25—30%, monosomie 7 în 50% și del (7)(q22—q35) în 35—40% din cazuri. Hipodiploidia este prezentă la 50% din bolnavi și rezultă prin pierderi ale cromozomilor 5, 7, 8, 17 și 18. Alte anomalii interesează cromozomii 12p, 21q, 3p și 19p. Tratamentul cu Etoposid și Tenoposid — inhibitori ai topoizomerazei II — induce specific translocații t(11;21) iar agenții alkilanți par să atace preferențial cromozomii 5 și 7. Pe cromozomul 5, în regiunea 5q31, au fost localizate gene care codifică factori de creștere și receptori ai factorilor de creștere a căror pierdere ar putea avea un rol important în inițierea procesului leucemogen: familia genelor pentru interleukine (IL4, IL5, IL3, CMCST și IL9), gena EGR1, gena receptorului CSF1 și gena care mediază răspunsul la interferon.

Policitemia vera

14% din bolnavii netratați prezintă clone citogenetic anormale. Proporția cazurilor cu anomalii cromozomiale crește în urma tratamentului (30%) și atinge 85% înaintea transformării leucemice. Anomaliile sunt reprezentate de trisomii 8 și 9 și deleții 20q sau duplicații ale brațului lung al cromozomului 1. În faza leucemică se înregistrează monosomii 7 (20%) și deleții 5q (40%) care ar putea fi consecința tratamentelor administrate.

1.7.1.4. Leucemia mieloidă cronică (LGC)

În subcapitolul 6 sunt descrise aspectele citogenetice ale fazelor cronică și acută ale LGC, și sunt comentate aspectele moleculare ale translocației (t(9;22). La 5—10% din bolnavii aflați în faza indolentă a LGC se notează variante ale t(9;22) în care sunt implicați și alți cromozomi (translocații complexe) sau în care brațul lung al cromozomului 22 apare a fi translocat pe un alt cromozom. Chiar și în această situație analiza moleculară evidențiază gena de fuziune BCR/ABL. Prognosticul nu este diferit în cazul prezenței altor translocații, iar bolnavii cu simptomatologie de LGC la care examenul citogenetic nu decelează t(9;22)(Ph negativi) se împart în două categorii: cei cu rearanjare BCR/ABL prezentă doar la nivel molecular și cei care suferă, de fapt, de o altă boală mieloproliferativă (leucemie mielomonocitară cronică, metaplazie mieloidă agnogenică). Se poate, așadar, considera că, în realitate, nu există LGC Ph negative și, implicit, că translocația BCR/ABL reprezintă evenimentul leucemogen primar.

Tratamentele uzuale nu conduc la dispariția celulelor cu t(9;22) nici în cazul instalării remisiunilor. La unii dintre bolnavii tratați cu interferon alfa se înregistrează, totuși, scăderi semnificative ale proporției de celule Ph pozitive. Analiza citogenetică reprezintă un instrument util în monitorizarea bolnavilor la care s-a efectuat transplant de măduvă hematogenă, deoarece permite detectarea bolii reziduale minime și anticiparea recăderilor.

1.7.2. BOLI LIMFOPROLIFERATIVE

1.7.2.1. Leucemii acute limfoblastice (LAL)

Anomaliile cromozomiale sunt prezente la 70—94% din bolnavii cu LAL, proporţia depinzând de tehnicile utilizate şi de tipul de boală. Ca şi în LAM, unele anomalii se asociază cu un anumit subtip, definit atât morfologic cât şi imunologic, în timp ce alte anomalii sunt comune mai multor subtipuri.

Interpretarea preparatelor citogenetice este grevată de unele dificultăţii: cromozomii au adesea un contur ceţos, scămoşat, iar benzile sunt neclare şi imperfect delimitate. De aceea, originea unor cromozomi marker şi provenienţa unor segmente translocate nu pot fi întotdeauna riguros precizate.

Anomalii numerice în LAL

Una dintre caracteristicile leucemiilor acute limfoblastice la copii este incidenţa înaltă a hiperdiploidiei, de regulă cu peste 50 de cromozomi. Hiperdiploidia include trisomii ale cromozomilor 4, 6, 10, 17, 18, 20 şi 21. Cromozomii implicaţi în aceste trisomii sunt aceiaşi, indiferent dacă hiperdiploidia realizează numere superioare sau inferioare cifrei de 50. Hiperdiploidia cu mai mult de 50 de cromozomi se asociază cu o evoluţie favorabilă, în timp ce numerele modale sub 50 conferă bolii un prognostic sever. În 30—40% din LAL, atât la copii cât şi la adulţi, nu se notează prezenţa de modificări numerice. Aproximativ 1/3 din celulele leucemice ale adulţilor cu LAL au o constituţie cromozomială pseudodiploidă; această proporţie este mai redusă la copii, la care mai frecventă este hiperdiploidia. Hipodiploidia este rară în LAL, comparativ cu LAM, în care 20% din cazuri prezintă celule cu mai puţin de 46 de cromozomi. Se confirmă astfel aserţiunea potrivit căreia o leucemie cu mai mult de 50 de cromozomi este puţin probabil să fie mieloblastică, în timp ce o leucemie cu hipodiploidie este improbabil să fie limfoblastică. Deşi hipodiploidia apare foarte rar în LAL, pierderile masive de cromozomi conducând la numere modale de până la 24 sunt aproape exclusiv întâlnite în LAL şi în forma limfoidă a crizei blastice din LGC. Cazurile de LAL cu cariotip aproape haploid au o serie de trăsături comune: majoritatea pacienţilor sunt adulţi, histologic se încadrează în formele 1 şi 2 ale clasificării FAB, iar celulele sunt CALLA+. Cromozomii X, Y şi 21 sunt, de regulă, păstraţi, iar perechile 10, 14 şi 18 sunt pierdute mai rar decât ceilalţi cromozomi.

Prezenţa sau absenţa metafazelor normale în măduva hematogenă a bolnavilor cu LAL constituie un parametru important pentru evaluarea prognosticului. S-a constatat că la copii proporţia cazurilor având în exclusivitate metafaze normale (NN) sau mixturi de metafaze normale şi anormale (NA) este mai înaltă, iar proporţia celor având numai metafaze anormale (AA) este mai redusă decât la adulţi. La copii nu s-a evidenţiat nici o corelaţie cu rata remisiunilor, durata remisiunii şi durata supravieţuirii, în timp ce la adulţi, bolnavii NN au avut rate mai înalte ale remisiunii şi au supravieţuit mai mult decât cei NA şi AA. Între grupurile NA şi AA nu au existat diferenţe în ce priveşte evoluţia bolii. Re-

zultă, aşadar, că în LAL evoluţia bolii este condiţionată într-o măsură mai mare de extinderea anomaliilor numerice şi de tipul de aberaţii structurale decât de prezenţa sau absenţa metafazelor normale.

Instabilitatea cariotipică este un fenomen care se produce foarte frecvent în LAL. În timpul recăderilor, 30—80% din bolnavi prezintă o mare varietate de modificări adiţionale. Analizele citogenetice seriate relevă progresiunea cariotipică, tradusă prin comutarea de la NA la AA şi achiziţii de anomalii adiţionale, numerice şi structurale, suprapuse sau derivate din cele iniţiale. S-au înregistrat, de asemenea, emergenţa de noi clone şi dispariţia clonelor anterioare.

Modificări structurale „specifice" în LAL

Câtă vreme LAL continuă să fie definite pe baza criteriilor morfologice şi citochimice, termenul „specific" este inadecvat pentru majoritatea translocaţiilor decelate până în prezent. Cromozomul Ph, de exemplu, nu poate fi considerat specific pentru LAL, iar translocaţia t(8;14) nu caracterizează numai tipul L3 al LAL, ci şi limfoamele nehodgkiniene cu celule mici, neclivate, precum şi unele sarcoame imunoblastice. Celulele cu t(4;11) pot avea trăsături mieloide sau monocitoide. Aceste observaţii nu constituie argumente împotriva posibilei relevanţe pentru diagnostic şi prognostic a translocaţiilor specifice în LAL; ele dezvăluie, mai degrabă, limitele investigaţiilor morfologice şi citochimice. Translocaţiile specifice nu reprezintă markeri ai subtipurilor definite clinic şi morfologic, ci pot fi considerate markeri ai originii celulelor leucemice, aşa cum o demonstrează şi corelarea lor cu anumite subseturi caracterizate prin imunofenotipare (tabelele 1.2 şi 1.3).

Tabelul 1.2

Rearanjări cromozomiale în limfoproliferările cu celule B

Rearanjare	Boala	Gene implicate	
t(4;11)(q21;q23)	LAL preB, LAL mixte	f	MLL
t(9;22)(q34;q11)	LAL, LAL mixte, LAM	ABL	BCR
t(1;19)(q23;p13)	LAL preB	PBX1	E2A
t(5;14)(q31;q32)	LAL preB cu eozinofilie	IL3	IGH
t(8;14)(q24;q32)	LAL B, LB, LMNH	MYC	IGH
t(8;22)(q24;q11)	LAL B, LB	MYC/PVT1	IGL
t(2;8)(p11—12;q24)	LAL B, LB	IGK	MYC/PVT1
t(11;14)(q13;q32)	LLC, LPL, MM	BCL1, PRAD1	IGH
t(14;19)(q32;q13)	LLC, LMNH	IGH	BCL3
t(2;14)(p13;q32)	LLC B, LMNH	REL	IGH
t(8;22)(q21;q11)	LLC B, LMNH	BCL2	IGK
t(14;18)(q32;q21)	LMNH	IGH	BCL2
t(11;14)(q13;q32)	LMNH, MM, LPL	PRAD1, BCL1	IGH
t(10;14)(q23;q32)	LMNH	LYT10	IGH

LAL=leucemie acută limfoblastică; LB=limfom Burkitt; LLC=leucemie limfocitară cronică; LPL=leucemie prolimfocitară; MM=mielom multiplu; LMNH=limfom malign nehodgkinian; IGH=gena lanţului greu al imunoglobulinelor; IGL=gena lanţului uşor al imunoglobulinelor.

Tabelul 1.3

Rearanjări cromozomiale în limfoproliferările cu celule T

Rearanjare	Boala	Gene implicate	
t(8;14)(q24;q11)	LAL	MYC	RCTA
inv(14)(q11;q32.3)	LAL, LLC	RCTA, RCTD	IGH?
t(10;14)(q24;q11)	LAL	HOX11	RCTD
t(1;14)(p34;q11)	LAL	TAL1	RCTD
t(11;14)(p15;q11)	LAL	RBTN1 (TTG)	RCTD
t(11;14)(p13;q11)	LAL	RBTN2	RCTD
t(7;9)(q34;q32)	LAL	RCTB	TAL2
t(7;9)(q34;q34)	LAL	RCTB	TAN1
t(7;10)(q34;q24)	LAL	RCTB	HOX1
inv(14)(q11;q32)	LAL, LLC	RCTA, RCTD	IGH
t(7;14)(p15;q11)	LAL	—	—
del(9)(p21)	LAL	IFNA/B?	

LAL=leucemie acută limfocitară; LLC=leucemie cronică limfocitară; RCT=receptorii celulelor T; IGH=lanț greu imunoglobulinic; IFN=interferon. .

Translocația t(9;22)(q34;q11)

Este întâlnită în 17% din cazurile de LAL la adulți și în numai 5% din LAL la copii. Celulele purtătoare ale acestei translocații au caracteristicile precursorilor celulelor B: lipsa imunoglobulinei intracitoplasmatice și pozitivitate pentru CALLA și TdT. t(9;22) se asociază cu hiperleucocitoză (75 000/mm^3) și cu prognostic sumbru (durata medie de viață — 15 luni). Analiza moleculară a translocației a relevat că punctul de rupere de pe cromozomul 22 este situat mai proximal decât cel implicat în formarea cromozomului Ph^1 din LGC. Utilizându-se probe ADN specifice pentru secvențele BCR și ABL s-a constatat că rearanjarea moleculară 9;22 este prezentă la aproximativ 30% din bolnavii cu LAL.

Translocația t(4;11)(q21;q23)

Incidența acestei rearanjări este de 8%, iar distribuția are un aspect bimodal: apare la copiii mai mici de 18 luni sau la bolnavii care au depășit vârsta de 10 ani. Atât la copii cât și la adulți tabloul clinic și hematologic este caracteristic: masă leucemică abundentă cu leucocitoză extremă (peste 200 000/mm^3) și splenomegalie. Durata medie a supraviețuirii este redusă: 9 luni la copii și 7 luni la adulți. Imunofenotiparea relevă că majoritatea bolnavilor cu t(4;11) nu au LAL, ci o leucemie mielomonocitară foarte puțin diferențiată. Translocația produce o genă de fuziune MLL/AF4.

Translocația t(1;19)(q21;p13)

Această translocație — prezentă la 25% din copiii cu LAL preB — există sub două forme: echilibrată și neechilibrată, cu trisomie parțială 1 rezultând din prezența a doi cromozomi 1 aparent normali și a unui cromozom 19p+, al cărui material adițional este reprezentat de fragmentul 1q. Vârsta la care apare boala este foarte diferită, iar prognosticul

este mai favorabil. Imunofenotiparea relevă originea preB a celulelor purtătoare ale acestei translocații; celulele conțin în citoplasmă imunoglobulină și sunt CALLA+. Punctul de rupere de pe cromozomul 19 scindează gena E2A care codifică un factor de transcriere, cu pierderea consecutivă a exonilor răspunzători de sinteza domeniului prin care produsul genic se leagă la o secvență ADN specifică din intensificatorul genei lanțului ușor kappa al imunoglobulinelor. Ruptura de pe 1q21 interesează gena homeobox PBX1. Gena de fuziune care rezultă în urma translocației conține domeniul activator al E2A și domeniul de legare la ADN al PBX1. Factorului himeric de transcriere codificat de această genă i se atribuie rolul principal în inițierea creșterii neoplazice.

Leucemii bifenotipice și leucemii biliniare

Utilizarea tehnicilor de imunofenotipare permite decelarea în 10% din LAL și în 20% din LAM a unor forme caracterizate prin prezența simultană a markerilor specifici liniilor limfocitare și mielocitare. În leucemiile bifenotipice populația neoplazică este alcătuită din blaști care exprimă atât markeri limfocitari cât și markeri mielocitari (infidelitate de linie celulară). În leucemiile biliniare, în cadrul populației leucemice coexistă blaști cu markeri limfocitari și blaști cu markeri mielocitari. Aceste leucemii hibride se asociază frecvent cu translocațiile t(9;22), t(4;11) și monosomii 7.

Translocații specifice în LAL cu celule T

În legătură cu aspectele citogenetice ale LAL cu celule T se impun a fi menționate două observații: a) frecvența mare a cariotipurilor normale la bolnavii cu aceste afecțiuni (35%); b) implicarea în rearanjările cromozomiale a genelor care codifică receptorii celulelor T (TCRA și TCRD de pe 14q11, TCRB de pe 7q35 și TRCG de pe 7p15). Până în prezent au fost descrise următoarele translocații specifice pentru proliferările neoplazice ale celulelor T:

Translocația t(8;14)(q24;q11). Această translocație aduce în juxtapoziție gena TCRA și protooncogena myc, și este similară variantei care se asociază cu tipul Burkitt al LAL, având probabil aceleași consecințe asupra funcției proteinei MYC.

Translocația t(11;14)(p15;q11). Gena de pe cromozomul 11 — denumită Ttg1 (T-cell translocation gene) sau rombotina — codifică o proteină de 18 kDaltoni cu domenii omoloage celor prezente la factorii de transcriere. Hiperexprimarea genei, determinată de juxtapunerea la TCRD de pe cromozomul 14, pare să contribuie direct la transformarea malignă a celulelor purtătoare.

Translocația t(11;14)(p13;q11) prezintă un interes special deoarece banda 11p13 este implicată și în sindromul WAGR (vezi 2.2.17). Gena Ttg2 (sau rombotina 2) este înrudită cu Ttg1, iar activarea ei este consecința amplasării în aval de TCRD.

Translocația t(10;14)(q24;q11) este prezentă în aproximativ 7% din LAL cu celule T și conduce la rearanjarea genei homeobox HOX11 în vecinătatea genei lanțului D al TCR. Mecanismul prin care alterarea expresiei HOX11 intervine în transformarea fenotipului celular nu este cunoscut.

Translocația t(1;14)(p32;q11) conduce la activarea genei tal1 (numită și SCL sau TCL1), implicată foarte frecvent în LAL cu celule T. Translocația are o incidență de 3%, însă delețiile tal1 sunt întâlnite la 26% din bolnavi. Produsul genic — proteina TAL1 — este un membru al familiei de molecule „helix-loop-helix" (HLH) care conțin un domeniu de legare la ADN și domenii de dimerizare. TAL1 poate interacționa cu alte HLH formând heterodimeri. Cei formați cu E12 și E47 se leagă specific la secvența ADN a intensificatorului genei IgE. Dereglarea activității tal1 prin deleție sau translocație poate bloca diferențierea normală a celulelor T, contribuind astfel la transformarea malignă a acestora.

Translocația t(7;19)(q34;p13) implică gena TCRB și o genă denumită lyl1 care codifică o proteină HLH similară structural cu proteina TAL1 și având, probabil, aceleași funcții. Rolurile produsului genic LYL1 în diferențierea și proliferarea celulelor T nu sunt pe deplin elucidate.

1.7.2.2. Leucemia limfocitară cronică cu celule B (LLC-B)

Este cea mai frecventă formă de leucemie, reprezentând 30% din totalul cazurilor de hemolimfoproliferări maligne, cu excepția limfoamelor. Proporția cazurilor cu anomalii cromozomiale este variabilă, depinzând de stadiul evolutiv în care se efectuează analiza, și de mitogenii utilizați, dar nu depășește 60%. Principalele anomalii observate la bolnavii cu LLC sunt trisomia 12 (31%), anomaliile structurale ale cromozomului 13 (23%) și translocațiile care implică brațul lung al cromozomului 14 (19%). În stadiile terminale ale bolii apar translocații complexe. Semnificația prognostică a anomaliilor cromozomiale din LLC nu este stabilită. Una din translocațiile notate în LLC — t(14;19)(q32;q13) — determină rearanjarea genei lanțului greu al imunoglobulinelor (IGH) și a protooncogenei bcl3 care acționează ca inhibitor al unor factori de transcriere cunoscuți a interveni în diferențierea celulelor B. O altă translocație — t(11;14)(q13;q34) — aduce protooncogena bcl1 în vecinătatea locusului IGH.

Leucemia cu celule păroase

Este insuficient definită citogenetic deoarece proliferarea *in vitro* a celulelor leucemice este lentă, iar numărul acestora în periferie este redus. Cele mai frecvente modificări sunt rearanjările 14q32 și deleția brațului lung al cromozomului 6.

Mielomul multiplu și leucemia cu plasmocite

Incidența anomaliilor cromozomiale este de 40% în mielomul multiplu și de peste 90% în leucemia cu plasmocite. Tipurile de anomalii structurale nu diferă de cele observate în LLC și în limfoame, prevalente fiind t(11;14)(q13;q32) și rearanjările cromozomilor 1 și 6. Anomaliile numerice sunt reprezentate de monosomii 13, 16, 17, 18 și 20.

Leucemia cu celule T a adultului

Este o entitate nosologică definită pe baza criteriilor morfologice și clinice. Are o perioadă indolentă lungă, cu limfocitoză ca singură mani-

festare şi se asociază cu infecţia cu HTLV1; aria de distribuţie este limitată la anumite zone geografice (Asia de Sud-Est). Anomaliile cromozomiale sunt del(6)(q15 sau q21), rearanjări la nivelul benzilor 14q32 şi 14q11, trisomia 3.

1.7.2.3. Limfoamele maligne nehodgkiniene (LMNH)

Analiza citogenetică a acestui grup eterogen de tumori limfoide a întâmpinat dificultăţi generate pe de o parte de rata redusă a proliferării celulelor neoplazice şi de calitatea nesatisfăcătoare a preparatelor cromozomiale şi, pe de altă parte, de complexitatea configuraţiilor cariotipice, consecinţă a unei instabilităţi cromozomiale crescute. În mare măsură aceste dificultăţi au fost depăşite, iar în momentul de faţă există un acord unanim de a se considera că examenul cromozomial poate contribui, în conjuncţie cu imunofenotiparea, la îmbunătăţirea clasificării actuale a limfoamelor.

Limfomul Burkitt (LB)

Indiferent de caracterul endemic sau sporadic al bolii şi de prezenţa sau absenţa infecţiei cu virusul Epstein Barr, la 75—85% din pacienţii cu LB analiza cromozomială evidenţiază translocaţia t(8;14)(q24;q33). În cazul în care această translocaţie lipseşte, în locul ei sunt decelate translocaţiile variante t(8;22)(q24;q11) sau t(2;8)(p12;q24). Aceste translocaţii nu sunt specifice pentru LB: ele pot fi întâlnite în limfoamele cu celule mici neclivate, în limfoamele difuze cu celule mari, la bolnavii HIV pozitivi şi, mai rar, în LAL cu celule B. La nivelul punctului de rupere 8q24 se află protooncogena c-myc. Fiecare din cele trei translocaţii creează raporturi spaţiale strânse între c-myc şi una dintre genele imunoglobulinelor de pe crozomul 2p (gena lanţurilor uşoare kappa), 14q (gena lanţurilor grele) şi 22q (gena lanţurilor uşoare lambda). Ca urmare a noilor relaţii spaţiale, gena c-myc este activată, dobândind proprietăţi oncogenice (vezi figura 2.10). În adiţie la translocaţiile menţionate, în blaştii neoplazici mai pot fi întâlnite, în aproximativ 70% din cazuri, şi alte modificări cromozomiale neîntâmplătoare: duplicaţii parţiale ale cromozomului 1, rearanjări 13q34.

LMNH non Burkitt

Translocaţia t(14;18)(q32;q21) este prezentă în 85% din limfoamele foliculare cu celule B, în unele limfoame difuze, slab diferenţiate şi, mai rar, în LAL. Frecvent, t(14;18) este însoţită de trisomii 8, 7 şi 18, deleţii 6q şi rearanjări 17q, a căror apariţie marchează agravarea bolii. Pe cromozomul 18 este situată gena bcl2 care, în urma translocaţiei este amplasată în vecinătatea locusului IGH de pe cromozomul 14. Supraexprimarea bcl2 conduce la blocarea programului de apoptoză.

Translocaţia t(11;14)(q13;q32) implică gena IGH de pe cromozomul 14 şi gena bcl1 de pe cromozomul 11. Juxtapunerea acestor gene este observată în unele limfoame centrocitice cu grad intermediar de dife-

renţiere, în leucemiile cronice cu celule B şi în mielomul multiplu. S-a arătat recent că gena bcl1 codifică o ciclină G1 implicată în controlul ciclului celular.

Alte anomalii cromozomiale în LMNH

Cu o frecvenţă redusă, în LMNH se notează: t(3;22)(q27;q11), asociată cu limfoamele difuze, t(2;14)(p13;q32), care alterează funcţia genei rel, t(2;5)(p23;q35), asociată cu limfoamele anaplazice cu celule mari (histiocitoza malignă). În limfoamele cu celule T sunt, de regulă, implicate regiunile cromozomiale în care se află situate genele care codifică receptorii limfocitelor T (fig. 1.4) dar, surprinzător, la rearanjări participă şi regiunea 14q32 unde este localizată gena IGH. Recent s-a arătat însă că punctul de rupere din rearanjările limfoamelor cu celule T se situează la o distanţă de 10 000 kb faţă de IGH, la nivelul unei prezumtive protooncogene, denumită TCL1. În aproape toate tipurile de LMNH s-au mai notat: trisomii 3, 7, 12 şi 18, precum şi rearanjări 1p, 1q, 2p, 2q, 3q, 6q, 7p, 7q, 11p, 17p şi 17q.

1.7.2.4. Limfomul Hodgkin

Tabloul citogenetic al acestei boli este dominat de anomaliile numerice (hiperdiploidie până la aproape tetraploidie). Trisomiile cromozomilor 1, 5, 9, 15, 18, 22 şi X contribuie cel mai frecvent la realizarea hiperdiploidiei. Aberaţiile structurale interesează regiunile 6q, 8q, 11q, 14q. Anomaliile sunt multiple şi complexe (figura 1.5), incluzând adesea markeri neidentificabili. Nu au fost descrise anomalii specifice, iar analiza citogenetică nu apare a fi utilă pentru diagnostic şi prognostic.

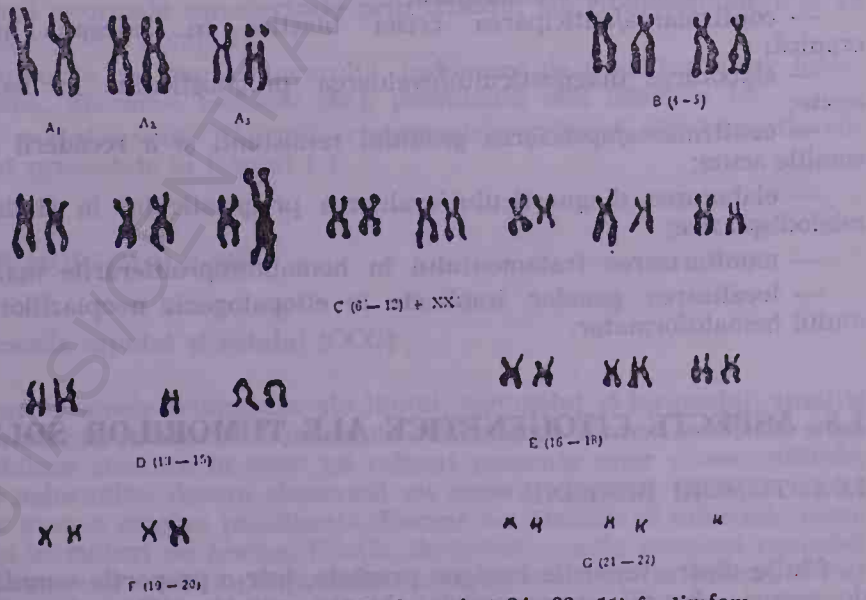


Fig. 1.4. Translocaţia complexă t(8;11;14) (q24;q22;q11) în limfom malign nehodgkinian cu celule T.

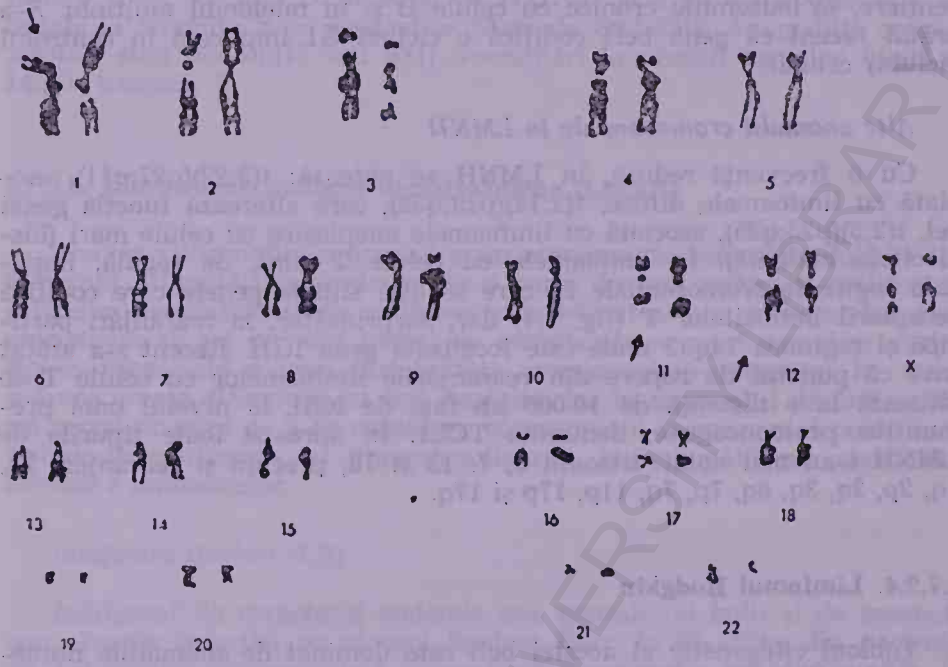


Fig. 1.5. Translocația complexă t(1;12;11)(p32;q24;q23) în boala Hodgkin.

Din cele prezentate se desprinde cu pregnanță concluzia că analiza citogenetică reprezintă un instrument capabil să contribuie semnificativ la:

— confirmarea/stabilirea diagnosticului în leucemia mieloidă cronică și în leucemia acută promielocitară;

— confirmarea/anticiparea crizei blastice în leucemia mieloidă cronică;

— elaborarea diagnosticului/evaluarea prognosticului în leucemiile acute;

— confirmarea/aprecierea gradului remisiunii și a recăderii în leucemiile acute;

— elaborarea diagnosticului/evaluarea prognosticului în sindroamele mielodisplazice;

— monitorizarea tratamentului în hemolimfoproliferările maligne;

— localizarea genelor implicate în etiopatogenia neoplaziilor sistemului hematoformator.

1.8. ASPECTE CITOGENETICE ALE TUMORILOR SOLIDE

1.8.1. TUMORI BENIGNE

Multe dintre tumorile benigne prezintă, într-o proporție semnificativă de cazuri, aberații cromozomiale clonale, neîntâmplătoare, asociate cu tipul de proliferare, evidențiabile încă din stadiile timpurii ale dezvol-

tării, ceea ce nu lasă nici un dubiu în ce privește implicarea lor în etiopatogenia creșterii neoplazice.

În meningioame se înregistrează pierderi ale cromozomului 22 și deleții 22q, fapt care sugerează că răspunzătoare de inițierea creșterii tumorale ar fi pierderea unei prezumtive antioncogene situată la nivelul 22q12-qter. În cursul evoluției clonale apar și alte modificări cariotipice care interesează cu precădere cromozomii 14, 1p și 11p.

80% din lipoame sunt citogenetic anormale. Principalele aberații apar a fi: (a) rearanjările structurale ale cromozomului 12q13—15 care realizează translocații echilibrate în formarea cărora poate fi implicat oricare din cromozomii complementului, dar mai ales cromozomul 3q27—28; (b) adiția unuia sau a mai multor cromozomi inelari.

Aproximativ 20% din leiomioamele uterine prezintă anomalii cromozomiale clonale, cea mai frecventă aberație fiind t(12;14)(q14—15;q23—24), urmată în ordine de del(7)(q21—q31), trisomia 12 și rearanjările brațului scurt al cromozomului 6. În tumorile caracterizate prin intensificarea activității mitotice și atipii celulare apar aberații secundare constând în rearanjări ale cromozomului 1 și cromozomi inelari.

Adenoamele pleomorfe ale glandelor salivare se clasifică din punct de vedere citogenetic în trei subgrupuri, definite prin anomaliile cromozomilor 3p21, 8q12 și, respectiv, 12q13—15. Primele două puncte de rupere interacționează frecvent formând translocația t(3;8)(q21;q12). De notat că 3p21 este implicat și în rearanjările din cancerul pulmonar cu celule mici și din cancerele renale, iar 12q13—15 — în rearanjările din lipoame și liposarcoame.

În adenoamele tiroidiene au fost descrise atât anomalii structurale simple cât și modificări numerice reprezentate de adiții ale cromozomilor 4, 5, 7, 9, 12 sau 16.

Adenoamele polipozice ale colonului prezintă în peste 50% din cazuri cariotipuri anormale caracterizate prin trisomii ale cromozomilor 7 și 13 și, mai rar, prin trisomia 18.

În tumorile benigne ale ovarului, indiferent de tipul histologic (chistadenoame, fibroame, tecoame etc.), prevalentă este trisomia 12.

Cele mai frecvente aberații cromozomiale primare din tumorile solide sunt prezentate în tabelul 1.4.

1.8.2. TUMORI MALIGNE

Cancerele capului și gâtului (CCG)

În carcinoamele scuamoase ale limbii, faringelui și laringelui, studiile citogenetice întreprinse atât pe celule cultivate pe termen scurt cât și pe linii celulare stabilite *in vitro* au relevat prezența unor clone multiple, aparent neînrudite. Aceste observații au generat ipoteza potrivit căreia CCG ar avea o origine policlonală. Recent s-a stabilit că diferitele clone prezente în culturi au aceeași filiație, derivând — prin procesul evoluției cariotipice — din celule progenitoare a căror existență în tumori a fost dovedită prin tehnica hibridizării *in situ* cu probe cromozomiale specifice.

Tabelul 1.4

Aberaţii cromozomiale primare în tumori solide

Rearanjare	Tumora
del(1)(p32—36)	Neuroblastom
t(1;6)(q11—12;q15—21)	Melanom malign
t(2;13)(q35—37;q14)	Rabdomiosarcom
del(3)(p14—32)	Carcinom pulmonar, carcinom renal
t(3;5)(p13;q22)	Carcinom renal
t(3;8)(p21;q12)	Adenom pleomorfic
t(3;12)(q27—28;q13—14)	Lipom
i(5p)	Carcinom vezică urinară
del(6)(q22—25)	Carcinom glande salivare, melanom malign
del(7)(q21—q31)	Leiomiom
+7	Carcinom vezică urinară
del(9)(p13—24)	Astrocitom
—9	Carcinom vezică urinară
t(9;12)(p13—22;q13—15)	Adenom pleomorfic
del(10)(q24)	Carcinom prostată
del(11)(p13)	Tumora Wilms
t(11;22)(q24;q12)	Sarcom Ewing
+12	Leiomiom
i(12p)	Tumori ale liniilor germinale
t(12)(q13—15)	Lipom
t(12)(q13—15)	Adenom pleomorfic
t(12;16)(q13;p11)	Liposarcom mixoid
t(12;14)(q14—15;q23—24)	Leiomiom
del(13)(q12—13)	Lipom
del(13)(q14)	Retinoblastom
t(19)(p13)	Carcinom ovarian
—22/del(22)(q12—13)	Meningiom
t(X;18)(p11;q11)	Sarcom sinovial
cromozomi inelari	Lipom
ROC, CM	Astrocitom, neuroblastom

ROC=regiuni omogen colorate; CM=cromozomi minusculi.

Într-o aceeaşi tumoră pot fi întâlnite atât celule cu numere cromozomiale care se dispun în jurul celui modal normal (aneuploidii), cât şi celule tetraploide. Pierderile de cromozomi din celulele tetraploide conduc la apariţia cariotipurilor evasitriploide, frecvent observate în CCG aflate în stadii avansate ale evoluţiei. Deleţiile cromozomiale, înregistrate în 40—60% din CCG, au un caracter neîntâmplător şi interesează regiuni deletate şi în cancere de alte tipuri histologice şi cu alte localizări. Unele dintre aceste regiuni sunt cunoscute a fi sediul unor gene implicate în iniţierea şi progresiunea cancerelor. Monosomiile parţiale 3p13-p24, 5q21-q22, 13q12-q24 şi 18q sunt întâlnite şi în cancerul pulmonar, carcinomul colonic familial, retinoblastom şi, respectiv, în cancerele rectocolonice sporadice. Se mai observă, de asemenea, deleţii şi rearanjări la nivelul cromozomilor 1p22, 8p22-p23, 9p21-p24, 10p13-pter şi 21q11, 2q21, pierderea cromozomului X inactiv la femei şi pierderi sau rearanjări ale cromozomului Y la bărbaţi, precum şi amplificări ale segmentelor 3q21-qter, 5p14-pter, 7p13-p22, 8q13-q24 şi 11q13-q23, exprimate prin regiuni omogen colorate şi cromozomi minusculi.

Cancere pulmonare

Din cele 4 tipuri histologice principale de cancere bronșice — carcinomul cu celule mici, carcinomul cu celule mari, adenocarcinomul și carcinomul cu celule scuamoase — doar primele două sunt satisfăcător caracterizate din punct de vedere citogenetic. Carcinoamele cu celule mici prezintă în 90% din cazuri o deleție 3p (figura 1.6), a cărei lungime diferă de la o tumoră la alta, dar care interesează obligatoriu segmentul 3p12-23, motiv pentru care se consideră că la acest nivel ar fi situate una sau mai multe gene supresoare ale creșterii tumorale. În afară de deleția 3p se mai notează rearanjări și deleții ale cromozomilor 1, 11p13, 17p, pierderi ale cromozomului 13, regiuni omogen colorate și cromozomi minusculi. În carcinoamele cu celule mari tablourile citogenetice sunt mai puțin coerente. Se notează atât aberații simple, cât și cariotipuri complexe, cu pierderi și rearanjări recurente ale cromozomilor 1p, 1q, 3p, 6q, 7q, 11p, precum și amplificări 5q și 7q.

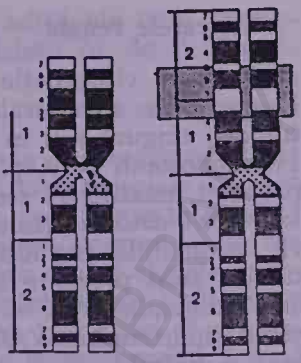


Fig. 1.6. Deleția del(3)(p14;p23) prezentă în carcinoamele pulmonare.

Cancere pleurale

Nu au fost remarcate anomalii specifice. Cariotipurile sunt, în general, hipodiploide sau hipotetraploide ca urmare a pierderii cromozomilor 1, 3, 4, 9, 14 și 22. La unii bolnavi, analiza efuziunilor pleurale a decelat și trisomii 5, 7, 11 și 20, precum și rearanjări ale regiunilor 1p, 3p, 9p și 22q.

Cancerele tractului digestiv

Există puține date referitoare la aspectele citogenetice ale *cancerelor gastrice*. Unele tumori au cariotipuri normale iar la altele se notează anomalii numerice, reprezentate de trisomii 8, 9, și 19, rearanjări 1p, 11p13, 3p21 și izocromozomi i(5p) și i(9q). Semnele citogenetice ale amplificării genice sunt frecvente.

Tabloul citogenetic al *cancerelor colorectale* este prezentat în paragraful 2.2.17.2.

În *adenocarcinoamele salivare* au fost înregistrate deleții 6q, pierderi ale cromozomului Y și trisomii 8, iar în *adenocarcinoamele pancreasului*, pe lângă pierderi ale cromozomului Y și trisomii 7, 10, 11, 14 și 20, se observă și configurații complexe, rezultate prin rearanjări numerice și structurale în care sunt implicați diferiți cromozomi ai setului. Recent s-a arătat că anomaliile complexe reprezintă indicatori ai unui prognostic grav, durata supraviețuirii bolnavilor cu astfel de modificări fiind de numai câteva luni. Numărul *carcinoamelor hepatocelulare* și al *hepatoblastoamelor* investigate până în prezent este prea mic pentru a permite formularea unor concluzii. Se pare, totuși, că în hepatoblastoame trisomia 20 și trisomia parțială 2q23-q35 reprezintă trăsături specifice.

Cancerele renale

Tabloul citogenetic al *carcinoamelor renale* este relativ uniform. Rearanjările structurale și deleţiile 3p11-21 sunt întâlnite în 90% din tumori, singure sau în asociere cu alte anomalii (trisomia 5q, trisomii 7, 14, monosomii 8, 9, pierderi ale sexcromozomilor). Acestea reprezintă, probabil, modificări secundare, apărute în cursul progresiunii tumorilor. În *nefroblastoame* (tumora Wilms) profilul cariotipic este cu totul diferit, anomaliile cromozomului 3p fiind notate doar ocazional. În unele tumori sunt prezente deleţiile 11p13-15, regiune în care se află situate antioncogenele WT1 — a cărei inactivare este răspunzătoare de producerea sindromului WAGR — și antioncogena WT2 (vezi 2.2.9.4.). Există însă și nefroblastoame în care singura anomalie este trisomia parţială a braţului lung al cromozomului 1, ceea ce sugerează prezenţa la acest nivel a unei alte gene cu rol în tumorigeneza renală. Un subtip histologic de cancer renal — *carcinomul papilar* — a fost demonstrat recent a se asocia specific cu o rearanjare a cromozomului X: translocaţia t(X;1)(p11.2;q21). Cromozomul X este implicat foarte rar în rearanjările din neoplazii; anomalii ale acestui cromozom au mai fost notate doar în sarcoamele sinoviale și în leiomioamele uterine. Faptul că la nivelul punctului de rupere Xp11.2 se află gena care codifică factorul de transcriere TFE3, exprimat doar în anumite ţesuturi, este de natură să sugereze că aceste forme de cancer apar ca urmare a unor dereglări ale procesului transcripţional. În carcinoamele papilare rearanjările cromozomului 3 sunt absente, iar anomaliile adiţionale interesează cromozomii 7 și 17, ceea ce sugerează, de asemenea, existenţa unor mecanisme independente prin care se realizează tumorigeneza renală.

Cancerele vezicii urinare

Aproximativ 40% din carcinoamele vezicale prezintă anomalii ale cromozomului 11 (izocromozomi de braţe scurte sau lungi, translocaţii și deleţii, mai ales ale braţelor scurte); în alte 40% din cazuri se notează modificări ale cromozomului 1 (deleţii și duplicări ale braţelor p și q). Aceste anomalii nu sunt niciodată singulare, ci se însoţesc de deleţii ale cromozomilor 3q, 8p și 17p. Analizele care au condus la aceste observaţii au fost, în general, efectuate pe specimene prelevate cu prilejul cistectomiilor, din tumori slab diferenţiate, invadante. Analizele practicate pe material biopsic provenit din tumori superficiale, bine diferenţiate, au relevat însă că anomaliile primare interesează exclusiv cromozomii 5, 7 și 9 și sunt reprezentate de izocromozomi i(5p), trisomii 7 și monosomii 9. Dintre acestea, monosomiile cromozomului 9 reţin în special atenţia, pe de o parte pentru că deleţiile 9 sunt infrecvente în alte cancere și, pe de alta — pentru că pe 9p sunt localizate genele interferonilor alfa și beta, a căror deleţie ar putea fi semnificativă pentru procesul carcinogenezei.

Cancerul de prostată

În adenocarcinoamele prostatei frecvenţa celulelor cu cariotipuri aparent normale pare să fie mai înaltă decât în alte cancere. Anomaliile citogenetice sunt nesistematizate și necaracteristice. Modificările nume-

rice rezultă prin pierderi ale cromozomului Y și adiții ale unui cromozom 7, iar cele structurale sunt reprezentate de deleții 7q, 8q și 10q.

Cancerele pielii

Atât în carcinoamele spinocelulare cât și în cele bazocelulare a fost descrisă prezența unor clone multiple, cu anomalii cromozomiale aparent neînrudite. Pentru explicarea acestor observații a fost invocată posibila origine policlonală a tumorilor epidermale, dar ipoteza alternativă — cea a apartenenței la țesutul conjunctiv stromal a unora dintre clonele anormale — nu poate fi, pentru moment, exclusă. Melanoamele maligne se caracterizează prin implicarea neîntâmplătoare în rearanjări a cromozomilor 1, 6 și 7. Cele mai frecvente anomalii ale cromozomului 1 sunt delețiile brațului scurt, cu punctele de rupere situate în regiunea 1p11-22. Cromozomul 6 prezintă deleții și rearanjări la nivelul 6q12-25. Cel mai adesea, rupturile cromozomilor 1 și 6 interacționează formând translocația t(1;6). În majoritatea tumorilor se constată prezența unui cromozom 7 supranumerar. Interesant de notat este faptul că melanoamele uveale au profiluri cariotipice complet diferite de cele ale tumorilor cutanate. Monosomia 3 și izocromozomul i(8q) reprezintă caracteristici ale acestor tumori.

Cancerele osoase și ale țesuturilor conjunctive

În osteosarcoame nu au fost observate anomalii cromozomiale sistematizate.

În 90% din sarcoamele Ewing și, uneori, în tumorile patogenic înrudite cu acestea — neuroepitelioamele periferice, tumora Askin și estezioneuroblastoamele — este prezentă translocația t(11;22)(q24;q12) (figura 1.7). În sarcoamele Ewing această translocație este frecvent însoțită de alte rearanjări: trisomia 8 și t(1;16)(q21;q23).

Condrosarcoamele nu se asociază cu anomalii cromozomiale specifice. În schimb, sarcoamele sinoviale sunt caracteristic definite de prezența translocației t(X;18)(p11;q11).

În histiocitoamele fibroase maligne se observă frecvent un cromozom marker rezultat prin adiția la 19p13 a unui material cromatinian a cărui origine nu a fost precizată. Markerul 19p+ este caracteristic tumorilor cu potențial înalt de invazie și metastazare.

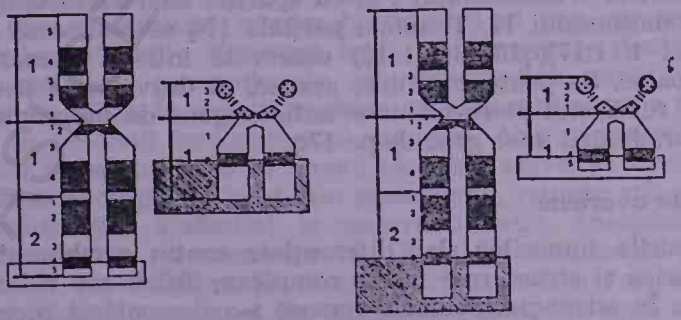


Fig. 1.7. Translocația t(11;22)(q24;q12) prezentă în sarcomul Ewing.

Din grupul liposarcoamelor, cele mixoide şi cele mixte sunt singurele care se asociază specific cu o rearanjare cromozomială, neîntâlnită în nici un alt cancer — translocaţia t(12;16)(q13;p11). Punctul de rupere de pe cromozomul 12 este identic cu cel care generează rearanjările din lipoame. La acest nivel sunt prezumate a se afla gene cu rol în diferenţierea adipocitelor: recombinarea lor cu gena de pe cromozomul 16 ar putea constitui evenimentul iniţiator al malignizării. Progresiunea liposarcoamelor mixoide se realizează pe o rută specifică — achiziţia anomaliilor secundare reprezentate de trisomiile 8, 19 şi izocromozomul i(7q) — complet diferită de ruta urmată de celelalte tipuri histologice, în care anomaliilor primare, constând cu precădere în cromozomi inelari, li se adaugă rearanjări numerice şi structurale nesistematizate.

În rabdomiosarcoame s-a notat, de asemenea, o asociere specifică: translocaţia t(2;13)(q35;q14) care este prezentă în majoritatea tumorilor, indiferent de tipul citologic şi de caracterul sporadic sau ereditar. Această translocaţie nu a mai fost observată în alte neoplazii.

Tumorile sistemului nervos

Studiile citogenetice efectuate în glioame relevă tendinţa acestor tumori — foarte eterogene în ce priveşte histotipul şi gradul de malignitate — de a se asocia cu trisomia 7, monosomiile 10 şi 22, pierderile gonozomilor, iar — în stadii mai avansate — şi cu cromozomi minusculi rezultaţi prin amplificarea genelor c-erbB, N-myc şi gli. Se pare, totuşi, că trisomia 7 şi pierderile cromozomilor X şi Y nu sunt trăsături caracteristice celulelor maligne: ele au fost observate şi în ţesutul cerebral peritumoral şi ar putea fi expresia mozaicismului normal *in vivo*. Deşi nu a fost identificată o anume succesiune a evenimentelor care se produc în cursul progresiunii tumorale, acumularea unui număr critic de defecte cromozomiale apare a fi decisivă pentru dobândirea fenotipului malign complet. Defectele secundare interesează cu precădere cromozomii 1, 9, 6, 3, 10 şi 17. În neuroblastoame au fost evidenţiate atât deleţii şi translocaţii cât şi regiuni omogen colorate şi cromozomi minusculi generaţi prin amplificarea genei N-myc. Aceştia din urmă sunt indicatori ai unei evoluţii foarte rapide. Incidenţa înaltă a deleţiilor 1p36 sugerează prezenţa la acest nivel a unei gene supresoare a creşterii tumorale. Regiunea 1p36 este frecvent implicată în producerea unei translocaţii dezechilibrate — t(1;17)(p36;q11-12) — care se soldează cu pierderea braţului scurt al cromozomului 1 şi cu apariţia unei extracopii a braţului lung al cromozomului 17. Trisomia parţială 17q se realizează şi în urma translocaţiei t(11;17)(q13-23;q11-12) observată într-un număr mare de neuroblastoame. Se poate conchide, aşadar, că dezvoltarea neuroblastoamelor este rezultatul pierderii unor antioncogene de pe cromozomii 1 şi 11 şi al supradozării unor gene de pe 17q.

Cancerele ovariene

Cariotipurile tumorilor slab diferenţiate conţin combinaţii de anomalii numerice şi structurale foarte complexe, dificil sau chiar imposibil de analizat. În adenocarcinoamele seroase s-a demonstrat recent că anomaliile cromozomiale primare sunt prevalent cele numerice, şi anume trisomiile 12, 8, 7 şi monosomia X. Trisomia 12 a fost înregistrată în 62% din cazuri, singură sau în asociere cu trisomiile 3 şi 5. Această

anomalie este considerată a se produce foarte devreme în dezvoltarea tumorilor deoarece se întâlnește frecvent și în neoplaziile ovariene benigne (fibroame, tecoame, adenoame). Rearanjările structurale recurente apar mai târziu și interesează cromozomii 1, 3p, 6q, 11p, 17p și 19, conducând la pierderi de material genetic. Punctele de rupere de pe cromozomul 1 tind să se concentreze în banda 1p36 și în regiunea distală a brațului lung. Cromozomul 19 participă la rearanjări atât prin regiunea 19q13 cât și prin banda 19p13 la care, frecvent, se atașează un fragment cromozomial de proveniență incertă, realizând markerul 19p+. În tumorile cu grad înalt de malignitate se notează prezența cromozomilor minusculi și a regiunilor omogen colorate.

Cancerele uterine

Atât în *carcinoamele scuamoase cervicale* cât și în *adenocarcinoamele endometriale* anomaliile cariotipice sunt multiple și variate. O serie de cromozomi apar a fi implicați preferențial în rearanjările numerice și structurale: 1, 2, 3, 6, 9, 11 și 17. Cele mai frecvente (80% din tumori) sunt anomaliile cromozomului 1: deleții și rearanjări care conduc la trisomii și tetrasomii parțiale, izocromozomi de brațe lungi; localizarea punctelor de rupere este însă lipsită de specificitate.

Cancerele testiculare

Indiferent de tipul histologic (seminoame, teratoame, carcinoame embrionare), cancerele testiculare se caracterizează prin prezența unui marker cromozomial — izocromozomul de brațe scurte 12 — însoțit cel mai adesea de alte anomalii numerice și structurale, în special ale cromozomului 1. Numărul modal de cromozomi în cancerele testiculare se situează în domeniul hiperdiploidiei și în cel al hipotetraploidiei, seminoamele tinzând să aibă numerele cromozomiale cele mai mari.

Cancerele mamare

Din multitudinea și diversitatea anomaliilor cariotipice din cancerele mamare se detașează, prin frecvența lor, cele ale cromozomilor 1p, 3p, 6q, 11p, 11q, 16q și 17p. Rearanjările structurale ale cromozomului 1 — prezente în 80% din tumori — interesează regiunea 1p11-21 și, în mod particular, banda 1p13. O altă anomalie foarte frecventă este cea care rezultă prin pierderea de material cromozomial de pe 17p. Studii foarte recente, în care s-a utilizat tehnica hibridizării *in situ*, au arătat că la nivel molecular alterările 17p sunt mult mai frecvente decât se poate stabili prin metodele convenționale ale citogeneticii, certificând astfel faptul că genele aflate în această regiune, printre care și gena p53, intervin decisiv în procesul tumorigenezei mamare. Aceeași metodă a hibridizării *in situ* a fost utilizată în scopul stabilirii secvenței evenimentelor care marchează evoluția de la stările premaligne, reunite sub denumirea de boala proliferativă a sânului, la cancerul invaziv. Aneuploidia rezultată prin pierderi ale cromozomilor 16, 17 și 18 a fost notată în majoritatea leziunilor hiperplazice, în timp ce trisomia 1 a fost evidențiată numai în proliferările maligne. Se subliniază astfel, din nou, rolul genelor de pe cromozomul 17 în promovarea cancerului mamar; celelalte modificări cariotipice, inclusiv cele ale cromozomului 1, par a interveni exclusiv în progresiunea tumorilor.

Cancerele glandelor endocrine

Literatura nu conține date suficiente pentru conturarea aspectelor citogenetice ale cancerelor endocrine, cu excepția celor ale *carcinoamelor tiroidiene*. Anomalii clonale diverse și variabile au fost descrise în carcinoamele foliculare, anaplazice și medulare ale tiroidei. În carcinoamele papilare tabloul citogenetic este mai coerent și apare a fi definit de rearanjările structurale ale cromozomului 10q11-26. O translocație recurentă este t(7;10)(q35;q21). La nivelul benzii 10q11 este localizată oncogena PTC — implicată în 25% din carcinoamele papilare — iar juxtacentromeric se află gena MEN2A, implicată în carcinomul tiroidian medular ereditar.

1.8.2.1. Importanța clinică a citogeneticii tumorilor solide

Ca și în cazul hemopatiilor maligne, investigațiile citogenetice în tumorile solide sunt capabile să furnizeze date de importanță majoră atât pentru elucidarea aspectelor fundamentale ale biologiei cancerului, cât și pentru creșterea gradului de acuratețe a diagnosticului și prognosticului.

Determinarea profilurilor cariotipice ale tumorilor s-a dovedit a fi în măsură să orienteze asupra modificărilor genetice răspunzătoare de constituirea fenotipului malign. În acest sens se cuvine a se reitera că multe dintre oncogenele și antioncogenele cunoscute în prezent au fost izolate și caracterizate ca urmare a clonării regiunilor genomice implicate în rearanjările cromozomiale recurente din cancere și care au fost detectate prin metodele citogeneticii.

În ce privește aplicațiile clinice ale analizei cromozomiale a tumorilor solide, se impune precizarea că, pentru moment, informativitatea rezultatelor acestei investigații este inferioară celei a datelor obținute în oncoproliferările hematologice datorită pe de o parte insuficientei argumentări statistice a corelațiilor dintre profilurile cariotipice și diferitele tipuri de tumori și, pe de altă parte, sensibilității reduse a metodei (rezultate pozitive se înregistrează în numai 50% din proliferările maligne). Totuși, natura digitală a informațiilor pe care le furnizează și gradul înalt de specificitate (proporția minimă a rezultatelor fals pozitive) conferă examenului cromozomial capacitatea de a funcționa cel puțin ca adjunct al metodelor convenționale de diagnostic al tumorilor solide. Astfel: decelarea unor anomalii cromozomiale clonale confirmă natura neoplazică a unei proliferări; lipsa aberațiilor nu are, însă, valoarea predictivă și nu exclude, așadar, posibilitatea unei neoplazii. Prezența unor anomalii numerice simple cu caracter clonal (—X, —Y și +7) poate fi, uneori, reflectarea unor fenomene fiziologice (senescență, mozaicisme); în schimb, anomaliile clonale masive impun întotdeauna diagnosticul de cancer. Utilitatea analizei citogenetice este evidențiată de unele situații, cum ar fi cea a efuziunilor pleurale de cauză necunoscută, în care diagnosticul citologic întâmpină, de regulă, dificultăți: detectarea anomaliilor cromozomiale în celulele lichidului pleural nu lasă nici un dubiu asupra caracterului malign a bolii.

O serie de anomalii cromozomiale solitare, precum și o serie de combinații nealeatorii de anomalii au un potențial predictiv foarte înalt,

acestea constituind markeri exclusivi ai unor tipuri histologice de cancere. Tumorile pediatrice mezenchimale cu celule mici, rotunde, creează dificultăți de diagnostic diferențial; dificultățile pot fi depășite cu sprijinul citogeneticii, deoarece este stabilit că sarcomul Ewing se asociază cu t(11;22), rabdomiosarcomul — cu t(2;13), sarcoamele sinoviale — cu t(X;18) și liposarcoamele — cu t(12;16).

Rezultatele analizei citogenetice se pot constitui, în unele cazuri, în indicatori independenți de prognostic. Tumorile vezicale neinvazive ale căror celule conțin cromozomi markeri recidivează în proporție de 90%, în timp ce riscul de recurență al tumorilor fără markeri este de numai 5%. Neuroblastoamele cu cariotipuri triploide au un prognostic vital foarte bun; în schimb, tumorile aneuploide, pseudodiploide și tetraploide sunt agresive și evoluează foarte rapid. Prezența anumitor rearanjări structurale poate fi un semn de rău augur: neuroblastoamele cu rearanjări ale cromozomului 1p sunt nerezecabile iar expectanța de viață este mai mică de 16 luni; spre deosebire de acestea, tumorile în care cromozomul 1 este indemn sunt, în majoritatea lor, curabile. Acestea nu sunt decât câteva dintre exemplele disponibile în prezent. Oricum, ele vor deveni mult mai numeroase, o dată cu perfecționarea tehnicilor citogenetice și cu dezvoltarea investigațiilor efectuate în scopul stabilirii corelațiilor clinico-cariotipice în tumorile maligne.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITARA

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. ASPECTE MOLECULARE ALE BOLII NEOPLAZICE*

2.1. CANCERUL — BOALA GENETICĂ CU CEL MAI COMPLEX MECANISM PATOGENIC

În accepţiunea sa actuală, termenul de boală genetică defineşte entităţile nosologice în al căror determinism intervin alterări cantitative şi/sau calitative ale informaţiei înscrise în ADN. Prezenţa alterărilor în genomul celulelor germinale şi, implicit, transmiterea lor la descendenţii bolnavului nu reprezintă un criteriu limitativ; boli genetice sunt şi afecţiunile cauzate de modificări ale moleculelor informaţionale ADN din celulele somatice, dacă acestea sunt permanente şi se transmit de la o generaţie celulară la alta (modificări mutaţionale).

O trăsătură fundamentală a cancerului o constituie transmiterea caracterelor malignităţii în succesiunea generaţiilor de celule tumorale. O altă trăsătură este aceea că toate celulele maligne sunt purtătoare ale unor multiple leziuni genetice, acumulate succesiv şi dispersate în întregul genom. Întrunind aceste trăsături, cancerul îndeplineşte condiţiile esenţiale pentru a fi considerat o boală genetică.

Alterările genetice răspunzătoare de imprimarea fenotipului malign interesează genele (cel puţin trei categorii de gene sunt implicate în patogenia cancerului), cromozomii (profilurile cariotipice anormale caracterizează majoritatea celulelor maligne) şi genomul în totalitatea sa (aneuploidia pare a fi prezentă în 99% din cancere, iar instabilitatea genomică reprezintă o caracteristică definitorie a celulei canceroase).

Genele implicate în patogenia cancerului acţionează prin trei mecanisme. Primul comportă modificări ale protooncogenelor: mutaţiile acestor gene normale determină activarea lor, soldată cu transformarea malignă a celulei purtătoare. Al doilea este orchestrat de genele de supresie a creşterii tumorale (antioncogene): inactivarea acestora conferă celulelor capacitatea proliferării autonome. Un al treilea mecanism, identificat recent, rezidă în alterarea mutaţională a unor gene „de stabilitate" sau „antimutatoare": mutaţiile acestor gene au ca rezultat eşecul reparării restituţionale a leziunilior ADN şi implicita apariţie a unui număr impresionant (de ordinul miilor) de leziuni ADN stabile, transmisibile la progeni.

Modificările în structura şi activitatea genelor menţionate pot avea loc în celulele somatice (forme necreditare de cancer) sau în celulele liniei germinale.

În funcţie de numărul mutaţiilor prezente în celulele germinale se descriu două situaţii: (1) mutaţia este singulară — deci insuficientă pen-

---

* Autorii mulţumesc dr. Dan Piţigoi pentru realizarea graficii acestui capitol.

tru malignizare; gameţii vor transmite mutaţia la descendenţi, ale căror celule vor fi, toate, purtătoare ale mutaţiei; un al doilea eveniment, produs în mod aleator, în una din celulele somatice ale progenilor va declanşa dezvoltarea unei tumori. Creşteri neoplazice se pot produce la oricare din membrii familiei care a moştenit mutaţia iniţială (forme ereditare de cancer); (2) într-o aceeaşi celulă germinală au loc mai multe evenimente mutaţionale, în urma cărora celula purtătoare suferă transformarea malignă şi dă naştere unei tumori gonadale. Aceste cancere nu se transmit la descendenţi deoarece restul celulelor germinale sunt genetic nemodificate.

Faptul că apariţia cancerului este consecinţa unor alterări ale materialului genetic a fost sugerat de o serie de observaţii morfologice, clinice şi experimentale potrivit cărora:

1) în celulele maligne sunt prezente anomalii numerice şi structurale, neîntâmplătoare, ale cromozomilor;

2) unele forme de cancer se transmit ereditar, iar anumite sindroame cu transmitere ereditară se asociază cu risc înalt de apariţie a cancerului;

3) celulele normale pot fi transformate malign ca urmare a expunerii la agenţi care lezează ADN;

4) numeroase tipuri de viruşi pot induce tumori interferând cu aparatul genetic al celulei gazdă;

5) unele anomalii genetice sunt iniţiatoare ale procesului neoplazic.

Prezentul capitol îşi propune să sublinieze şi să completeze — acolo unde este cazul — argumentarea implicării factorilor genetici în etiopatogenia bolii canceroase.

2.1.1. CELULELE MALIGNE SUNT PURTĂTOARE ALE UNOR ANOMALII CROMOZOMIALE NEÎNTÂMPLĂTOARE (Vezi capitolul 1)

2.1.2. UNELE CANCERE SE TRANSMIT EREDITAR, IAR UNELE SINDROAME EREDITARE SE ASOCIAZĂ CU RISC CRESCUT DE DEZVOLTARE A CANCERULUI

2.1.2.1. Sindroame neoplazice transmisibile ereditar

Sunt cunoscute peste 100 de boli monogenice ale căror fenotipuri includ diferite forme de cancer. Cele mai multe se transmit după modul autozomal dominant; doar câteva sunt recesive (tabelul 2.1).

Cancerele condiţionate monogenic sunt relativ rare şi se deosebesc de corespondentele lor determinate multifactorial — cu mult mai răspândite (cancere comune) — prin următoarele trăsături:

a) segregă în familii conform cu predicţiile modelului eredităţii monogenice; în familiile mici, ca urmare a penetranţei, cel mai adesea incomplete, a genei patologice, această trăsătură poate trece neobservată; de aceea, afirmarea determinismului monogenic este posibilă numai în urma investigării unor familii numeroase sau prin cumularea datelor obţinute prin investigarea mai multor familii;

Tabelul 2.1

Bazele genetice ale principalelor cancere ereditare

Cancer ereditar	Gena inactivată	Localizare cromozomială	Funcția proteinei normale
Retinoblastom	Rb	13q14	Factor de transcriere regulator al tranziției G1-S
Tumora Wilms Sindromul Beckwith-Wiedemann	WT1 WT2	11q13 11q15	Factor de transcriere ?
Polipoza colonică Cancerul colonic nonpolipozic ereditar	APC FCC/ HNPCC	5q21 2p	Modulator al interacțiunii caderine-catenine Corectarea erorilor replicării ADN
Sindromul Li-Fraumeni	p53	17q13	Factor de transcriere
Neurofibromatoza tip 1 Neurofibromatoza tip 2	NF1 NF2	17q11 22q12	GAP (proteină activatoare a GTP-azei) Transducție membranară
Sindromul neoplaziilor endocrine multiple	PRAD1	11q13	Ciclina D (progresiunea prin ciclul celular)
Cancer de sân	BRCA1	17q12—21	?

b) vârsta la care debutează boala este considerabil mai redusă (cancere pediatrice) comparativ cu vârsta apariției cancerelor comune corespunzătoare;

c) tumorile primare sunt, de regulă, multiple și multifocale, în timp ce neoplasmele comune sunt, frecvent, monocentrice.

Diferențele dintre cancerele pediatrice ereditare și sporadice sunt pertinent explicate de modelul Knudson, cunoscut sub numele de modelul celor două evenimente (two-hit model), și care va fi prezentat în paragraful 2.1.7.1.

2.1.2.2. Sindroame ereditare asociate cu risc crescut de apariție a cancerului

Bolile monogenice cu transmitere autozomal recesivă caracterizate prin fragilitate cromozomială și predispoziție la dezvoltarea unor cancere sindromul Bloom, ataxia-telangiectazia, anemia Fanconi, *Xeroderma pigmentosum*) au fost descrise în paragraful 1.4.

De precizat, în plus, că ceea ce se moştenește în cadrul acestor boli nu este riscul dezvoltării unei anumite forme de cancer, ci predispoziția la cancer, în general (tabelul 2.2).

Tabelul 2.2

Sindroame autosomal recesive cu predispoziție la cancere

Sindrom	Predispoziție	Anomalii ale ciclului celular	Anomalii ale reparării ADN	Număr gene anormale
Xeroderma pigmentosum	Carcinoame cutanate spino- şi bazocelulare Melanoame maligne	Netestate	Repararea prin excizie Repararea postreplicativă	9
Ataxia-telangiectazia	Leucemii acute (copii) Leucemie limfocitară cronică (adult) Tumori solide (mamare, gastrice, vezicale, etc.)	Blocare în G2	Presupuse	1
Sindromul Bloom	Tumori solide Leucemii	Blocare în G0 Blocare în G2	Presupuse (defect al ligazei?)	1
Anemia Fanconi	Leucemii acute mieloblastice Tumori solide (mai rar)	Blocare în G2	Presupuse	Minimum 2

Mutaţiile răspunzătoare de apariţia sindroamelor cu fragilitate cromozomială interesează gene implicate în menţinerea integrităţii structurale şi funcţionale a ADN. Disfuncţionalităţile introduse de aceste mutaţii în activitatea sistemelor de prevenire şi corectare a erorilor inerente replicării, recombinării şi reparării ADN generează permanent noi mutaţii la nivelul întregului genom dar — mai ales — în secvenţele ADN caracterizate printr-o susceptibilitate înaltă la alterări mutaţionale (aşa-numitele „pete fierbinţi").

Fenotipul „mutator", comun sindroamelor de fragilitate cromozomială, este cel care, generând instabilitate genomică, răspunde, în ultimă instanţă, de inducerea predispoziţiei genetice la neoplazii deoarece, augmentând semnificativ rata mutaţiilor — atât spontane cât şi provocate de agenţi mezologici —, favorizează apariţia alterărilor capabile să iniţieze şi să promoveze procesul malign.

Referitor la sindroamele cu fragilitate cromozomială, mai trebuie arătat că predispoziţia la cancere se manifestă nu numai la bolnavi — care sunt homozigoţi pentru gena patologică — ci şi la purtătorii heterozigoţi, al căror fenotip este aparent normal. Contribuţia acestora la determinarea incidenţei globale a bolii canceroase este, încă, dificil de estimat.

Recent a fost identificată și clonată gena ale cărei mutații se fac răspunzătoare de producerea ataxiei-telangiectaziei. Incidența acestei boli este redusă (1 la 40 000—100 000) dar frecvența heterozigoților în populația generală se cifrează la ~ 1%. Heterozigoții prezintă, într-o formă atenuată, două dintre trăsăturile bolii: predispoziția la cancere și sensibilitatea la acțiunea radiațiilor ionizante. Studiile epidemiologice au relevat că purtătorii unei singure alele mutante au un risc de dezvoltare a cancerelor de 3—4 ori mai înalt decât cel al populației generale și că incidența cancerelor de sân la femeile heterozigote o depășește de 3 ori pe cea înregistrată la homozigotele pentru gena normală. Gena ATM („Ataxia-Telangiectasia, Mutated") pare astfel să se plaseze pe prima poziție, înaintea genei BRCA1, pe lista factorilor de risc pentru cancerele mamare. Detectarea stării de heterozigot pentru gena ATM impune excluderea purtătorilor de la orice formă de iradiere cu radiații ionizante, inclusiv de la examenele radiologice de rutină.

2.1.3. DIFERENȚE CONDIȚIONATE GENETIC ÎN RĂSPUNSUL LA ACȚIUNEA AGENȚILOR CARCINOGENI CARE PRODUC LEZIUNI ADN

Majoritatea alterărilor mutaționale apar spontan, în sensul că producerea lor nu este condiționată de intervenția unor agenți mezologici identificabili sau de creșteri ale expunerii la agenți mutageni care se constituie în parte integrantă a mediului înconjurător (radiații cosmice, telurice, ultraviolete etc.). Aceste mutații, a căror rată de producere este relativ constantă (10^{-6} mutații per genă și per diviziune celulară), sunt consecința erorilor necorectate ale replicării și recombinării ADN, la care se adaugă leziunile ADN, eronat sau incomplet reparate.

Categoria mutațiilor induse include alterările consecutive acțiunii asupra ADN a unor variați agenți fizici, chimici și biologici, mulți dintre aceștia rezultând din activități umane.

Organismul uman este supus în permanență asaltului unor noxe dovedite a fi totodată mutagene, carcinogene și clastogene. Împotriva acestor noxe, organismele și-au dezvoltat sisteme complexe de apărare care funcționează înlăturând sau minimizând efectele nocive ale expunerii și asigurând astfel protecția informației conținută în moleculele ADN.

Substanțele chimice reactive pătrunse în organism sunt supuse acțiunii unor complexe enzimatice care, prin prelucrări succesive, le transformă în metaboliți inactivi. Există însă și situația inversă în care — în urma prelucrărilor metabolice — unele substanțe precarcinogene sunt transformate în carcinogeni potenți. Astfel, hidrocarburile policiclice aromatice, sau aflatoxina B_1 sunt activate în cursul metabolizării lor de către enzimele citocromului P-450, rezultând compuși capabili să interacționeze cu moleculele ADN, alterându-le structura.

Enzimele activatoare sunt inductibile, iar gradul inductibilității variază de la un individ la altul. Teoretic, persoanele caracterizate printr-o inductibilitate înaltă a acestor enzime ar trebui să aibă un risc crescut de a dezvolta neoplazii maligne când sunt expuse la hidrocarburi policiclice aromatice sau la alte substanțe chimice metabolizate de sistemul enzimatic al citocromului P-450.

Relația a fost recent confirmată de datele care atestă că la fumătorii cu fenotip inductor, riscul dezvoltării cancerului pulmonar este semnificativ mai înalt comparativ cu fumătorii având fenotip neinductor. De menționat că, în urmă cu două decenii, uneia dintre enzimele complexului citocrom P-450 — aril hidrocarbon hidroxilaza — i se atribuise valoare predictivă în ce privește riscul dezvoltării cancerului pulmonar la fumători. Datele statistice au fost, însă, echivoce.

În rezumat, inactivarea sau, dimpotrivă, activarea agenților ambientali chimici cu potențial carcinogen reprezintă funcții ale unor sisteme enzimatice complexe. Enzimele acestor sisteme sunt specificate de gene ale căror mutații produc disfuncționalități globale ale sistemului, traduse prin răspunsuri anormale la acțiunea carcinogenilor chimici și, implicit, prin diferențe în predispoziția la cancer.

2.1.4. DIFERITE CATEGORII DE VIRUȘI POT INDUCE TUMORI INTERFERÂND CU APARATUL GENETIC AL CELULEI GAZDĂ

Unii viruși favorizează apariția tumorilor în organismele pe care le infectează acționând prin mecanisme indirecte. Un subiect infectat cu virusul imunodeficienței umane (HIV) are un risc substanțial crescut de a dezvolta anumite cancere — în special sarcom Kaposi și limfoame nehodgkiniene cu celule B; tumorile sunt consecința imunosupresiei cauzate de infecția cu HIV, și nu a integrării provirusului în genomul celulei gazdă; prin deprimarea imunității mediate celular, HIV creează celulelor endoteliale și, respectiv, celulelor B transformate de alți agenți posibilitatea de a prolifera nelimitat, fără a fi distruse de efectorii sistemului imunologic.

Mecanismul uzual al carcinogenezei virale este însă cel direct, dependent de integrarea genomului viral în ADN al celulei gazdă. În funcție de particularitățile materialului genetic pe care îl conțin, virușii transformați se înscriu în trei categorii.

Prima, și cea mai numeroasă, este reprezentată de retrovirușii acut transformanți. Aceștia sunt viruși ARN (oncornaviruși) care conțin în genomul lor gene inductoare de tumori (oncogene) foarte asemănătoare cu gene prezente în celule eucariote.

Inactivarea sau deleția oncogenei virale abolește capacitatea tumorigenică. Organizarea genomică a acestor viruși, al căror reprezentant tipic este virusul sarcomului Rous, este redată în figura 2.1 (vezi paragraful 1.4.1.).

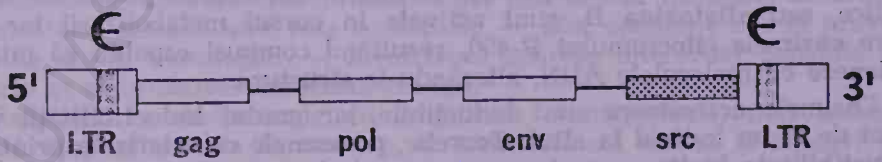


Fig. 2.1. Structura genomului ARN al virusului sarcomului Rous.
Sunt figurate cele 4 gene — gag, pol, env și src — și regiunile de reglare (LTR) care conțin intensificatorii transcrierii (E).
Caseta plină reprezintă gena transformată cu origine celulară (src).

A doua categorie include viruși acut transformanți ADN (papovavirușii, adenovirușii, virușii herpetici). Aceștia conțin gene inductoare de tumori, și care nu au corespondent în genomul eukariotelor. Proteinele codificate de aceste gene disturbă desfășurarea programului normal de creștere și proliferare celulară, în principal prin formarea de complexe stabile și nefuncționale cu o serie de proteine ale celulei gazdă, implicate în controlul multiplicării (ca de exemplu proteinele Rb sau P53, complexate de proteinele virale E6 și E7 ale virușilor polioma, de antigenele T ale SV40 sau de proteinele E1A și E1B ale adenovirușilor). Oncoproteinele virale conferă, în acest mod, celulelor infectate autonomie a proliferării, iar adiția altor modificări genetice se soldează cu transformarea malignă (vezi paragraful 2.2.13).

A treia categorie este reprezentată de viruși care nu conțin gene transformante, dar care dereglează prin proteinele lor specifice activitatea genelor celulare, stimulând astfel proliferarea celulei gazdă. Infecția cu acești viruși nu este suficientă pentru inducerea cancerului: realizarea fenotipului malign este obligatoriu condiționată de intervenția altor agenți cu potențial carcinogen. De exemplu, infecția cronică cu virusul hepatitei B constituie un factor de risc pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular; riscul este cu mult mai mare în zonele geografice în care endemiei de hepatită B i se suprapune consumul de alimente contaminate cu aflatoxina B_1 (cunoscută a fi un puternic carcinogen cu tropism hepatic).

Virușii din această categorie sunt lent transformanți: cancerul apare după perioade lungi, de ordinul anilor, de la infecția specifică.

Din punctul de vedere al patologiei oncologice umane, acești viruși prezintă o importanță deosebită. Cancerele asociate infecțiilor cu virusul hepatitei B, cu virusul Epstein Barr, sau cu cel al leucemiei/limfomului uman cu celule T (HTLV-1) reprezintă aproximativ 15% din totalul cancerelor (tabelul 2.3).

2.1.5. ALTERĂRILE GENETICE — FACTORI INIȚIATORI AI PROCESULUI MALIGN

Opiniile referitoare la semnificația modificărilor genetice în cadrul procesului de tumorigeneză sunt împărțite: unii autori continuă să le considere ca fiind implicate exclusiv în progresiunea bolii, atribuindu-le așadar numai un rol patogenic; alții — și aceștia reprezintă astăzi majoritatea — susțin că evenimentul primar, declanșator al creșterii neoplazice este unul esențialmente mutațional.

Promotorii acestui din urmă punct de vedere și-au construit ipoteza pornind de la următoarea premisă: cu cât o modificare genetică este mai frecventă într-un anumit tip de tumoră, cu atât mai probabilă este semnificația ei etiologică.

Argumentele invocate în sprijinul acestei ipoteze au fost cele oferite de cercetarea aspectelor citogenetice ale hemolimfoproliferărilor maligne. Unele leucemii și limfoame se caracterizează prin prezența de translocații cromozomiale specifice care, schimbând amplasarea genomică a unor protooncogene, le activează transformându-le în oncogene. Astfel, peste 95% din bolnavii cu leucemie granulocitară cronică sunt pur-

Tabelul 2.3

Infecţii virale asociate cu cancere umane

Virus	Tumori asociate	Localizare geografică	Gene virale implicate	Mecanism posibil
Viruşi ADN				
v. papiloma	Cancere anogenitale (în special de col uterin)	Global	E6 şi E7	Complexarea proteinelor RB şi P53
v. hepatitic B	Carcinom hepatocelular	Africa tropicală Asia de Sud-Est	X pre S	Formarea de produşi himerici care stimulează proliferarea
v. Epstein-Barr	Limfom Burkitt	Africa de Vest		Cooperare cu oncogena c-myc
	Carcinom nazofaringian	Asia de Sud-Est	EBNS-1	?
	Limfom cu celule B (în infecţii HIV)	Global	EBNA-2	?
	Limfom Hodgkin		LMP	?
Viruşi ARN				
HTLV1	Limfomul/leucemia cu celule T a adultului	Asia de Est	tax	Dereglare transcripţională
			rex	Dereglare posttranscripţională
HIV1	Sarcom Kaposi Limfom cu celule B		—	Supresia imunităţii celulare

tători ai translocaţiei 9;22 care activează protooncogena c-abl de pe cromozomul 9 fuzionând-o cu regiunea bcr de pe cromozomul 22; la aproape toţi bolnavii cu limfom Burkitt, protooncogena c-myc de pe cromozomul 8 este fuzionată cu una din genele imunoglobulinelor, ca urmare a translocaţiilor 8;14, 8;22 sau 2;8; în proporţie de 100%, bolnavii cu leucemie acută granulocitară prezintă o genă hibridă PML-RARA, produs al translocaţiei 15;17 (vezi capitolul 1).

În prezent pare a nu mai persista nici o îndoială în legătură cu faptul că modificările genetice reprezintă — cel puţin în unele instanţe — evenimentul iniţiator al dezvoltării neoplaziilor.

Dovezi peremptorii în acest sens au fost aduse de studiile efectuate pe şoareci transgenici.

2.1.5.1. Transgenicitate

Strategia obţinerii animalelor transgenice comportă injectarea în celule ale liniei germinale a unor secvenţe ADN clonate; consecutiv proceselor recombinaţionale, o parte din ADN exogen va fi integrat în ge-

nomul celulelor receptoare; descendenții rezultați în urma fertilizării gameților purtători ai secvențelor genice introduse artificial (transgene) vor exprima constitutiv în celulele lor informația genetică adițională; în funcție de specificitatea elementelor reglatoare care li se atașează (promotori, intensificatori), transgenele pot fi făcute să se exprime numai în anumite țesuturi sau linii celulare.

Șoarecii purtători de transoncogene reprezintă modelul experimental cel mai adecvat pentru obținerea informațiilor privitoare la: efectele biologice ale oncogenelor asupra creșterii, proliferării și diferențierii unui spectru larg de tipuri celulare; interacțiunea colaborativă a oncogenelor în dotarea secvențială a celulelor neoplazice cu atributele malignității; rolul modificărilor genetice în inițierea procesului neoplazic.

Explorarea capacității oncogenelor de a iniția cancere la animalele transgenice a condus la constituirea unui amplu corp de informații care demonstrează cât se poate de convingător că anumite oncogene virale sau celulare funcționează inducând transformarea malignă. Cele mai bine documentate informații sunt cele care privesc rolul oncogenelor c-abl, c-myc, Ha-ras.

Introducerea în genomul șoarecilor a genei hibride bcr-abl determină constant inițierea unor procese maligne la nivelul sistemului hematoformator; tipul de proliferare depinde de lungimea secvențelor hibridizate, elementul reglator atașat genei și amprentarea parentală. În funcție de acești parametrii se produc: limfoame pre-B, tumori cu celule T, leucemii limfo- și mieloblastice sau un sindrom asemănător leucemiei granulocitare cronice umane.

Șoarecii purtători ai transgenei myc cuplată cu intensificatorul transcripției lanțului greu al imunoglobulinelor dezvoltă limfoame limfoblastice cu celule pre-B și B care infiltrează frecvent ficatul și plămânii. La femelele transgenice pentru gena c-myc la care s-a atașat secvența promotoare a virusului tumorii mamare murine (MMTV) apar, în cursul gestației, adenocarcinoame mamare.

Transgena MMTV/v-ras induce cu frecvență înaltă adenocarcinoame mamare focale, atât la masculi, cât și la femele. Mai rar, această transgenă determină apariția unor hiperplazii benigne ale glandelor lacrimale, a adenocarcinoamelor glandelor salivare și a limfoamelor.

Un interes special au suscitat observațiile făcute pe șoareci transgenici pentru gena bcl-2 activată prin cuplare cu diferite elemente reglatoare virale sau celulare. La aceste animale se înregistrează creșteri de 2—5 ori ale numărului de limfocite B în sânge, măduva hematogenă, splină și ganglionii limfatici; dezvoltarea unor tumori tipice cu celule B este, însă, cu totul excepțională. În limfoamele foliculare umane, gena bcl-2 este adusă — prin translocația 14;18 — în vecinătatea locusului activator IgH (locusul lanțurilor grele ale imunoglobulinelor). În urma acestui eveniment, nivelul exprimării genei bcl-2 în limfocitele B crește considerabil. Două sunt trăsăturile notabile pe care supraexprimarea genei bcl-2 le imprimă celulelor B foliculare: capacitatea de a se sustrage acțiunii mecanismelor inductoare ale morții celulare programate — apoptoza — și, corelată cu aceasta, rezistența sporită la agenții citotoxici. Consecința o reprezintă expansiunea populației de celule B purtătoare ale translocației 14;18, realizată nu prin intensificarea proliferării, ci pe seama creșterii longevității. Deși prin ea însăși nu este capabilă

să determine transformarea neoplazică, gena bcl-2, prelungind durata de viață a celulelor în care este supraexprimată, creează substratul pentru producerea — stochastică — a unui al doilea eveniment mutațional care va iniția procesul malign. Cel mai adesea, acesta este reprezentat de activarea genei c-myc.

Concluzia pe care o impun datele de mai sus este aceea că unele dintre alterările structurii ADN prezente în tumorile maligne intervin nemijlocit în inițierea procesului neoplazic. În general, aceste alterări sunt caracteristic asociate cu tipuri histologice specifice de cancer sau cu tipuri histologice foarte înrudite, se întâlnesc la majoritatea bolnavilor cu aceeași formă morfoclinică de cancer, pot fi evidențiate încă din stadiile cele mai timpurii ale dezvoltării tumorale, iar corespondentul lor citogenetic este reprezentat de anomaliile cromozomiale primare.

2.2. TUMORIGENEZA — UN PROCES MULTISTADIAL

2.2.1. EVOLUȚIA TUMORILOR COMPORTĂ ACHIZIȚIA SECVENȚIALĂ DE NOI ALTERĂRI GENETICE ȘI EPIGENETICE

Fundamentele de ordin experimental, epidemiologic și citogenetic ale concepției — unanim acceptate — potrivit căreia ontogeneza tumorilor maligne este un proces evolutiv multistadial au fost prezentate în capitolul 1, iar detaliile despre genele implicate în tumorigeneză figurează în paragrafele următoare. Acest paragraf conține o descriere cu caracter general a evenimentelor moleculare asociate cu evoluția secvențială a bolii canceroase.

Caracterizarea în termeni moleculari a diferitelor etape a căror parcurgere este obligatorie pentru realizarea plenară a fenotipului malign a devenit posibilă, îndeosebi, datorită utilizării animalelor transgenice și a tehnicilor de inserție genică mediată de retrovirusi.

Abordarea prin aceste mijloace a problematicii evoluției cancerului a condus la obținerea de răspunsuri pertinente la multe dintre întrebările majore generate atât de complexitatea modului în care acționează și interacționează factorii implicați în procesul malign, cât și de interacțiunile — la fel de complexe — ale acestor factori cu aparatul genetic celular.

Alterările genetice din cancere au fost testate în ce privește capacitatea lor de a acționa prin una sau mai multe din următoarele modalități:

— creșterea activității proliferative a unuia sau mai multor tipuri celulare;

— reducerea potențialului de diferențiere al anumitor celule;

— abrogarea apoptozei;

— dotarea cu potențial invaziv și de colonizare a unor teritorii rezervate altor celule;

— anularea cerințelor pentru factori de creștere și a răspunsului la factori inhibitori produși de celulele vecine.

S-a urmărit, de asemenea, să se stabilească dacă acțiunea diferitelor gene implicate în cancer este independentă de tipul celular sau, dimpotrivă, cuplată cu un anumit program de diferențiere, și dacă ruta parcursă, respectiv ordinea acumulării alterărilor genetice este obligatoriu aceeași în cazul dezvoltării unui anumit tip de tumoră, sau dacă există rute alternative care converg producând un același fenotip.

Coroborarea datelor astfel obținute cu informațiile provenite din investigarea directă a aspectelor moleculare ale cancerelor umane a permis construirea unor scenarii în care sunt precizate nu numai evenimentele genetice și secvența acumulării lor, ci și relațiile cauzale ale acestora cu fiecare din etapele dezvoltării tumorale.

Astfel de scenarii au fost construite pentru multe dintre cancerele umane. Ele s-au dovedit a avea, pe lângă o deosebită importanță teoretică, și o remarcabilă utilitate practică, prin faptul că pun la dispoziția clinicienilor cele mai obiective criterii de evaluare a gradului de dezvoltare a tumorii.

După cum rezultă din analiza scenariilor existente, coordonatele generale ale evoluției diferitelor tipuri de cancere umane sunt esențial aceleași. Etapele inițiale sunt critice, în sensul că depășirea lor este obligatorie pentru progresiunea tumorii. Definitorii pentru celulele aflate în stadiile inițiale sunt creșterea capacității de autoînnoire, prin care se asigură persistența indefinită a clonei, și dobândirea unui anumit grad de autonomie. Aceste proprietăți caracterizează starea preneoplazică. Tranziția la starea neoplazică și progresiunea ulterioară a tumorii se realizează prin activarea unei rețele complexe de gene aflate în relații de intercondiționare. Activarea se face secvențial, în etape a căror succesiune poate fi aleatorie. În cadrul evoluției unui același tip de tumoră, o etapă poate fi înlocuită cu alta, importantă fiind nu ordinea activării genelor ci suma modificărilor acumulate.

Numărul stadiilor evolutive și, implicit, cel al alterărilor genetice necesare dobândirii fenotipului malign complet depind de tipul tumorii. Evoluția cancerelor sistemului hematoformator comportă parcurgerea a numai 4—6 etape, deoarece majoritatea celulelor din alcătuirea acestor tumori sunt inerent migratorii.

Evoluția tumorilor solide se realizează prin parcurgerea unui număr mai mare de stadii (până la 11 sau 12 în cazul neoplasmelor laringelui și, respectiv, ale prostatei). Explicația diferenței rezidă în faptul că dobândirea potențialului invaziv și metastazant necesită stadii adiționale.

2.2.2. DOMINANȚĂ ȘI RECESIVITATE ÎN EXPRIMAREA FENOTIPICĂ A GENELOR IMPLICATE ÎN CANCER

Dintre genele ale căror alterări mutaționale contribuie la realizarea fenotipului malign, unele sunt dominante — protooncogenele, iar altele recesive — antioncogenele.

Dominanța și recesivitatea nu reprezintă proprietăți intrinseci ale unor gene sau ale alelelor acestora. Termenii de dominanță și recesivitate definesc exclusiv relația dintre fenotipurile corespunzătoare celor

trei genotipuri ce se pot realiza prin asocierea într-un genom diploid a două alele ale aceleiași gene. De pildă, în cazul alelelor A și B, cele trei genotipuri posibile sunt AA, AB și BB. În situația în care un caracter fenotipic particular apare la indivizii AA și AB dar lipsește la cei cu genotip BB, alela A este considerată a fi dominantă în raport cu alela B. Dacă fenotipul indivizilor AB este intermediar sau combină caracterele fenotipurilor AA și BB, raportul dintre alelele A și B este considerat a fi de semi- sau codominanță.

Altfel spus, genele dominante își exercită efectul în stare heterozigotă, în timp ce genele recesive se manifestă fenotipic numai în stare homozigotă.

Marea majoritate a mutațiilor dominante se manifestă prin câștig de funcție („gain of function"); mutațiile recesive determină întotdeauna o pierdere de funcție („loss of function").

Modalitățile prin care se realizează câștigul de funcție sunt multiple:

— creșterea dozajului genic (prin duplicația sau amplificarea unei gene);

— exprimarea ectopică sau temporal alterată a ARN mesager (prin mutații la nivelurile promotorilor, al joncțiunilor dintre exoni și introni, al regiunii 3′ netranslate a ARN mesager etc.);

— activitatea crescută sau constitutivă a proteinelor prin creșterea duratei de viață și, respectiv, prin menținerea proteinelor în stare activată ca urmare, de exemplu, a mutațiilor care împiedică hidroliza GTP sau care stimulează adenilat-ciclaza;

— efecte dominant negative (prin mutații care în stare heterozigotă antagonizează activitatea alelei normale producând un fenotip nul);

— alterări structurale ale proteinelor;

— sinteza de proteine cu funcții noi (prin juxtapunerea unor domenii funcționale aparținând unor proteine diferite, ca urmare a formării unor gene hibride);

În cadrul tumorigenezei, câștigul de funcție — consecință a exprimării fenotipice cu caracter dominant a oncogenelor — s-a dovedit a se realiza prin fiecare din modalitățile de mai sus, fapt care va fi ilustrat cu exemple specifice în paragrafele următoare.

Pierderea de funcție este rezultatul diminuării până la dispariție a activității proteinelor codificate de genele de supresie a creșterii tumorale (antioncogene). Mutațiile inactivatoare, amprentarea genomică, deleția uneia sau a ambelor alele ale antioncogenelor sunt cauzele cele mai frecvente ale pierderii de funcție. Acestora li se adaugă mutațiile cu efect dominant negativ.

Mutația dominant negativă se caracterizează prin faptul că proteina anormală pe care o specifică gena mutantă are capacitatea de a neutraliza produsul alelei normale sau produsul unei alte gene normale, situată într-un locus diferit. Sugestiv este exemplul proteinelor multimerice care depind de oligomerizare pentru a deveni funcționale. Prezența într-un multimer a unei subunități mutante având capacitate de legare intactă, dar ale cărei domenii catalitice sunt alterate, este de natură să abolească funcția întregului multimer.

În cazul genei recesive de supresie a creșterii tumorale p53, o serie de mutații în stare heterozigotă se dovedesc a avea efecte biologice iden-

tice cu cele ale mutațiilor homozigote, deoarece oligomerizarea celor produși proteici — normal și anormal — conduce la formarea unui dimer nefuncțional; deși alela normală este prezentă în genom în stare activă, funcția ei apare a fi pierdută, situația mimând lipsa efectivă a genei.

2.2.3. ONCOGENELE NU FIGUREAZĂ ÎN INVENTARUL DE GENE AL CELULELOR NORMALE

Oncogenele sunt prezente în (a) genomul celulelor neoplazice, în care funcționează imprimând trăsăturile fenotipul malign și în (b) genomul virușilor tumorali.

Corespondentele oncogenelor, aflate în celulele normale, se constituie într-o clasă eterogenă de secvențe ADN — colectiv denumite protooncogene — ale căror funcții se exercită, în principal, în cadrul proceselor de creștere, proliferare și diferențiere celulară.

Consecutiv unor modificări produse în structura și/sau activitatea transcripțională a protooncogenelor, acestea se convertesc în echivalente „maligne" — oncogenele.

Cu privire la termenul de protooncogenă — virtual generator de confuzii — se impune precizarea că el definește doar parțial proprietățile elementelor reunite sub această denumire; protooncogenele nu sunt simpli precursori ai oncogenelor: ele îndeplinesc roluri esențiale în desfășurarea activităților celulare normale, conversia lor în gene tumorale nefiind decât un eveniment accidental.

Semnificația actuală a termenului de protooncogenă pare, așadar, a fi mai largă decât cea care i se atribuise inițial. Protooncogenele sunt secvențe ADN care codifică proteine localizate în diferite compartimente celulare, se exprimă în stadii diferite ale ciclului celular, sunt implicate în cascada de evenimente ce asigură desfășurarea normală a proceselor de reproducere și diferențiere celulară; ocazional, în urma intervenției unor factori activatori, protooncogenele se pot transforma în oncogene.

Oncogena este, deci, forma anormală, activată, a unei protooncogene; ea poate rezida în genomul celular, situație în care poartă numele de oncogenă celulară (c-onc), sau în genomul viral — oncogenă virală (v-onc). Oncogena este definitoriu caracterizată prin capacitatea de a induce și/sau promova cancere. Produșii specificați de oncogene sunt oncoproteinele, care, pentru a fi diferențiate de oncogene, sunt notate — prin convenție — cu majuscule.

Cercetările care au condus la edificarea conceptului de oncogenă au debutat la sfârșitul anilor '70 prin investigarea capacității transformante a virusului care produce sarcomul aviar Rous (VSR). Acest virus, aparținând familiei *Retroviridae*, provoacă, într-un interval scurt de timp de la infectare, transformarea sarcomatoasă a celulelor mezenchimale ale puilor de găină (virus acut transformant).

Este cunoscut că, după pătrunderea în celulele permisive, genomul retrovirușilor — constituit dintr-o moleculă ARN monocatenară — este convertit de către enzima reverstranscriptaza într-o copie ADN care ulterior este integrată în cromozomii celulei gazdă. Pe lângă cele trei

gene comune tuturor retrovirușilor — gag, pol și env — care asigură infectivitatea și capacitatea replicativă, genomul VSR conține o a patra secvență nucleotidică denumită v-scr (de la sarcom); prin tehnici de hibridizare ADN—ADN în care s-a folosit ca probă gena v-scr marcată radioactiv, s-a stabilit că această secvență este prezentă — într-o formă similară dar nu identică — la toate vertebratele; prin analogie, ea a fost numită c-src; s-a mai stabilit, de asemenea, că inserția în genomul celulei gazdă a v-scr se face răspunzătoare de transformarea malignă deoarece virușii care au suferit o mutație inactivatoare a acestei gene sunt lipsiți de capacitate transformantă, păstrându-și însă nealterată activitatea replicativă.

Prezența în genomul viral a genei scr se explică astfel: din cauza unor erori ale mecanismelor recombinaționale, secțiunile în molecula ADN pe care le comportă excizarea genomului viral pot să cadă la distanță față de limitele acestuia; secvențe ADN ale gazdei situate între secțiuni vor rămâne atașate la genomul viral; dacă, întâmplător, secvențele capturate de virus conțin o genă cu rol în creșterea celulară, ca de exemplu c-scr, și dacă această genă este plasată sub influența activatoare a puternicilor promotori și intensificatori aflați în regiunile care flanchează genomul viral (repetări terminale lungi, LTR), virusul își va dobândi capacitate transformantă.

Infectând alte celule, virionul purtător al genei capturate va introduce în genomul acestora o copie adițională activă a secvenței normale c-src, dotând astfel celula cu proprietatea creșterii autonome.

Studii ulterioare, în care s-a utilizat modelul experimental elaborat pentru investigarea capacității tumorigene a VSR, au validat ipoteza oncogenelor virale și au condus la identificarea altor 30 de secvențe transformante derivate din gene celulare normale (tabelele 2.4, *a*; 2.4, *b*).

Tabelul 2.4, a

Principalele oncogene virale cu corespondent celular

Oncogena	Virusul sursă	Tipul de tumoră indusă la gazdă
v-abl	V. leucemiei murine Abelson	Leucemie pre-B, sarcom
v-erbB	V. eritroblastozei aviare	Eritroleucemie, fibrosarcom
v-erbA		
v-fes	V. sarcomului felin Fujinami	Sarcom
v-fms	V. sarcomului felin	Sarcom
v-fos	V. osteosarcomului murin FBJ	Osteosarcom
v-jun	V. avian ASV 17	Fibrosarcom
v-kit	V. sarcomului felin NZ 4	Sarcom
v-mos	V. sarcomului murin Moloney	Sarcom
v-myb	V. mieloblastozei aviare E 26	Mieloblastoză
v-myc	V. avian MC 29	Sarcom, carcinom
v-raf	V. sarcomului murin 3611	Sarcom
v-H-ras	V. sarcomului murin Harvey	Sarcom, eritroleucemie
v-K-ras	V. sarcomului murin Kirsten	Sarcom, eritroleucemie
v-rel	V. reticuloendoteliozei aviare	Reticuloendotelioză
v-sis	V. sarcomului simian	Sarcom
v-ski	V. sarcomului scuamos aviar	Sarcom, carcinom
v-src	V. sarcomului aviar Rous	Sarcom
v-yes	V. sarcomului aviar Yamagushi	Sarcom

Tabelul 2.4, b

Caracteristicile principalelor protooncogene transduse în genomurile virale

Proto-oncogena	Localizare cromozomială	Produsul protooncogenei umane	
		Localizare	Funcție
c-abl	9q34	Membrana plasmatică	Tirozinkinază nonreceptor
c-erbB1	7p13	Membrana plasmatică	Tirozinkinază receptor (EGFR)
c-erbA	3p21—25	Nucleu	Receptor triiodotironină (T3)
c-fes	15q25—26	Membrana plasmatică	Tirozinkinază nonreceptor
c-fms	5q33	Membrana plasmatică	Tirozinkinază receptor (CSF1R)
c-fos	14q24—31	Nucleu	Prin asociere cu c-jun formează factorul de transcriere AP1
c-jun	1p32	Nucleu	
c-kit	14q11—22	Membrana plasmatică	Tirozinkinază receptor (MGFR)
c-mos	8q22	Citoplasmă	Serin/treoninkinază (factor citostatic)
c-myb	6q22	Nucleu	Factor de transcriere
c-myc	8q24	Nucleu	Factor de transcriere
c-raf	3p25	Membrana plasmatică	Serin/treoninkinază
c-H-ras	11p15	Membrana plasmatică	Proteina G
c-k-ras	12p12	Membrana plasmatică	Proteina G
c-rel	2p13-cen	Nucleu	Reglator al factorului de transcriere NFkB
c-sis	22q12—13	Secreție extracelulară	PDGF (lanțul B)
c-ski	1q22—24	Nucleu	Factor de transcriere
c-src	20q12	Membrana plasmatică	Tirozinkinază nonreceptor
c-yes	18q21	Membrana plasmatică	Tirozinkinază nonreceptor

EGFR=receptorul factorului de creștere epidermal; CSF1R=receptorul factorului stimulator al coloniilor 1; MGFR=receptorul factorului de creștere a macrofagelor; PDGFR=receptorul factorului de creștere derivat din trombocite.

Conceptul de oncogenă a fost consolidat de datele obținute câțiva ani mai târziu prin experimente de transfecție a ADN. Sursa de ADN a fost reprezentată de o linie tumorală umană, numită EJ, stabilită din celulele unui carcinom al vezicii urinare. Celulele receptoare au fost cele ale unei linii nemaligne de fibroblaști de șoarece — 3T3. ADN extras din celulele liniei EJ și introdus în fibroblaștii 3T3 a determinat apariția în plăcile de cultură a unor colonii celulare prezentând toate trăsăturile malignității (tabelul 2.5). În plus, implantarea celulelor transformate malign la șoareci imunologic deficienți s-a soldat cu dezvoltarea de noduli tumorali. Întrucât transfecția de ADN provenit din celule normale nu a avut un astfel de efect, s-a considerat că în genomul celulelor carcinomului vezical există o genă care, acționând dominant, determină transformarea malignă. În urma aplicării procedurilor de clonare, gena a fost identificată, iar secvențierea ei a evidențiat înaltul grad de similitudine structurală cu oncogena virală H-ras (prezentă în virusul sarcomului Harvey).

Ulterior a fost relevată existența a numeroase oncogene, prezente atât în genomul celular, cât și în cel viral. De menționat, totuși, că există și oncogene virale fără corespondent celular, precum și oncogene pre-

Tabelul 2.5

Principalele caracteristici ale celulelor transformate in vitro

ANOMALII MEMBRANARE

A. Intensificarea transportului de membrană
B. Creşterea mobilităţii proteinelor membranare
C. Activarea endo- şi exocitozei

ANOMALII ALE ADEZIVITĂŢII

A. Diminuarea aderenţei la substrat şi sfericizare
B. Scăderea nivelului fibronectinei extraplasmalemale
C. Creşterea producţiei de activatori ai plasminogenului şi ai proteolizei

ANOMALII ALE CREŞTERII ŞI DIVIZIUNII

A. Reducerea necesarului de factori de creştere
B. Pierderea dependenţei de ancorare
C. Anomalii ale aparatului mitotic şi aneuploidizare
D. Dobândirea capacităţii de proliferare indefinită (imortalizare)
E. Capacitate de inducere a tumorilor la animale susceptibile (tumorigenicitate)

zente exclusiv în genomul celular. Principalele caracteristici ale acestora sunt redate în tabelul 2.6.

2.2.4. PROTEINELE SPECIFICATE DE ONCOGENE SUNT COMPONENTE ESENŢIALE ALE CIRCUITELOR DE SEMNALIZARE INTRACELULARĂ

Rolul potenţial al protooncogenelor în tumorigeneză rezultă şi din faptul că produşii proteici ai acestor gene reprezintă relee esenţiale ale circuitelor biochimice prin care este guvernată întreaga activitate celulară.

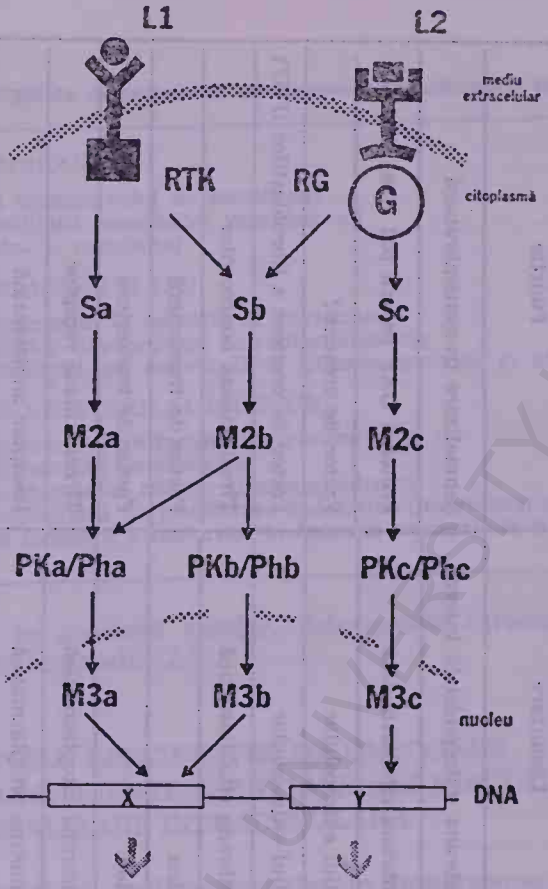
Gradul înalt de conservare a structurii protooncogenelor constituie o dovadă convingătoare a importanţei pe care o au produşii lor proteici pentru viaţa celulei. Protooncogena ras, care codifică o proteină cu activitate GTP-azică implicată în semnalizarea transmembranară, este prezentă atât în genomul mamiferelor, cât şi în cel al drojdiilor; omologia secvenţelor nucleotidice în regiunile determinante ale funcţiei proteinei Ras depăşeşte 60%, ceea ce demonstrează că protooncogena ras s-a păstrat practic nemodificată pe parcursul unei perioade de peste 600 de milioane de ani.

Celulele tuturor organismelor sunt dotate cu multiple circuite de semnalizare, specializate în identificarea şi recepţionarea semnalelor din mediul extracelular şi în iniţierea răspunsurilor adecvate. Liganzii extracelulari (semnalele) se cuplează specific cu receptorii de pe suprafaţa membranei plasmatice, activând diferitele sisteme de semnalizare intracitoplasmatice (mesageri secunzi) care, la rândul lor, transmit informaţia mesagerilor terţiari (factori de transcriere). Aceştia acţionează modulând activitatea transcripţională a genelor, inclusiv a celor care controlează proliferarea şi diferenţierea celulară (figura 2.2).

Tabelul 2.6

Caracteristicile principalelor oncogene fără corespondent viral

Oncogenă	Mod de identificare	Localizarea cromozomială a protooncogenei umane	Produsul codificat de protooncogena umană	
			Localizare	Funcție
bcl 2	Translocație	18q21	Membrana mitocondrială internă	Semnalizare transmembranară
bcr	Translocație	22q11	Membrana citoplasmatică	Proteină GAP pentru p21 Ras
int 1	Inserție mutațională	12q15	Spațiul extracelular	Factor de creștere?
int 2	Inserție mutațională	11q13	Spațiul extracelular	Factor de creștere a fibroblaștilor (FGF)
lck	Inserție mutațională	1p32—35	Membrana citoplasmatică	Tirozinkinază nonreceptor
L-myc	Amplificare	1p32	Nucleu	Factor de transcriere
N-myc	Amplificare		Nucleu	Factor de transcriere
neu	Transfecție	6	Membrană citoplasmatică	Tirozinkinază receptor
mas	Transfecție	6q24	Membrană citoplasmatică	Receptor angiotensină
RARA	Translocație	17q12	Nucleu	Factor de transcriere
N-ras	Transfecție	1p22	Membrană citoplasmatică	Proteină G (GTP-ază)
ret	Transfecție	10q11	Membrană citoplasmatică	Tirozinkinază receptor
trk	Transfecție		Citoplasmă	Tirozinkinază receptor



ACTIVITATE CELULARĂ ŞI MITOGENEZĂ

Fig. 2.2. Transducţia semnalelor la nivel intracelular (din multitudinea de căi paralele de transducţie a semnalelor sunt figurate doar trei — a, b şi c).

Transmiterea semnalelor se realizează pe căi caracterizate prin: (1) convergenţă (două tipuri diferite de receptori, RTK şi RG, pot acţiona asupra aceluiaşi substrat, Sb); (2) divergenţă (un mesager secund, M2b, poate activa două substraturi diferite — PKa/Pha şi Pkb/Phb); (3) redundanţă (două căi diferite, a şi b, pot acţiona în final asupra aceleiaşi gene — gena X, determinând răspunsuri identice). Într-o etapă a evoluţiei ontogenetice a unei celule se realizează un număr limitat de interacţiuni (reprezentate prin săgeţi); o serie de interacţiuni sunt specifice anumitor tipuri celulare. Astfel, un acelaşi ligand poate determina efecte variate şi specifice.

Simboluri: L=ligand; RTK=receptor cu activitate tirozin kinazică; RG=receptor cuplat cu proteina G; S=substrat; M2=mesager secund; PK=proteinkinază citoplasmatică; Ph=fosfatază citoplasmatică; M3=mesager terţiar (factor de transcriere).

BCU IAŞI OLD UNIVERSITY LIBRARY

La suprafaţa celulelor se află mai multe tipuri de receptori. Receptorii neenzimatici (fără activitate kinazică) sunt conectaţi cu proteine care determină formarea de mesageri secunzi: proteina G (cu activitate GTP-azică), adenilat-ciclaza (sintetizează AMP ciclic), fosfolipaza C (generează inozitol trifosfat, producând eliberarea intracelulară de calciu şi de diacilglicerol şi activând astfel proteinkinaza C).

Receptorii catalitici sunt reprezentaţi de kinaze (care fosforilează tirozina — tirozinkinaze, sau serina şi treonina — serin/treoninkinaze) şi fosfataze (care asigură defosforilarea aceloraşi substraturi).

Proteinkinazele sunt principalii reglatori ai activităţii celulare; dintre acestea, tirozinkinazele par a fi, în mod particular, implicate în reglarea proliferării.

Ca urmare a eliberării mesagerilor secunzi sau a modificării activităţii kinazice a receptorilor catalitici, în celule se declanşează activări în cascadă ale unor kinaze intracitoplasmatice, a căror ţintă finală o constituie factorii de transcriere a mesajului genetic. Factorii de transcriere sunt proteine care se leagă la secvenţe nucleotidice specifice situate în elementele reglatoare ale genei, modulând astfel activitatea transcripţională şi, implicit, expresia genică.

Proteinele implicate în semnalizarea intracelulară şi — cu precădere — factorii de transcriere, se caracterizează prin structura lor modulară; modulii sunt independenţi funcţional (domenii de legare la ADN, de oligomerizare, enzimatice etc.) şi remarcabil de asemănători structural, chiar în cazul în care aparţin unor proteine foarte diferite (de exemplu, regiunile prezentând omologie cu oncoproteina *src*—SH2 şi SH3 sunt domenii necatalitice conservate la o serie de proteine citoplasmatice cu rol în controlul răspunsului intracelular la factori de creştere).

Proteinele codificate de protooncogene participă la desfăşurarea normală atât a programelor necesare supravieţuirii, cât şi a celor care conduc la moartea celulară. Activarea sau introducerea în genom a oncogenelor determină alterări calitative şi/sau cantitative ale proteinelor, soldate cu disturbarea programelor de supravieţuire sau cu blocarea apoptozei.

După criteriul funcţiei pe care o îndeplinesc, produşii proteici ai oncogenelor se clasifică în şapte categorii (figura 2.3).

A. Factori de creştere

O serie de oncogene codifică proteine care vor fi descărcate în spaţiile extracelulare. Aceste proteine sunt: a) factori de creştere tipici (oncogena sis codifică lanţul B al factorului de creştere derivat din trombocite — PDGF —, iar genele hst şi int codifică proteine din familia factorilor de creştere a fibroblaştilor — FGF); b) molecule foarte asemănătoare unor factori de creştere (de exemplu, produsul oncogenei int1). Oncogenele din această clasă acţionează prin mecanisme atât autocrine (stimulând proliferarea celulelor în care au fost sintetizate), cât şi paracrine (determinând proliferarea celulelor vecine sau vascularizarea tumorală prin stimularea angiogenezei). Ele contribuie la malignizare prin activarea permanentă şi exagerată a receptorilor membranari care amorsează cascada evenimentelor implicate în proliferarea sau diferenţierea celulară.

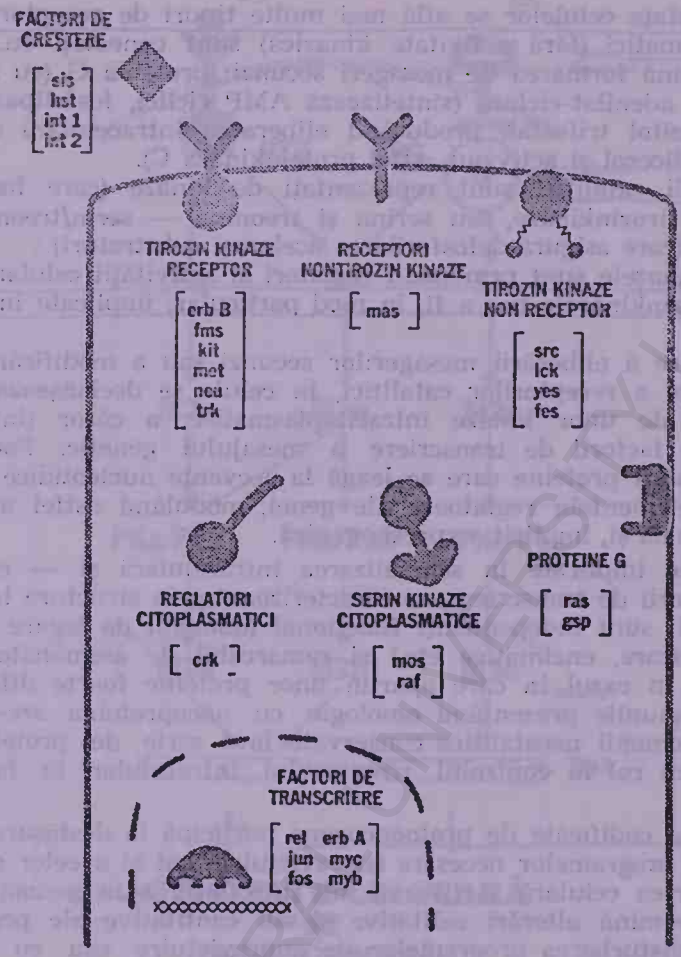


Fig. 2.3. Localizarea intracelulară şi funcţiile principalelor clase de oncogene.
Între paranteze sunt notate exemplele cele mai reprezentative.

Reducând necesarul de factori de creştere extrinseci, mecanismul autocrin măreşte gradul de autonomie a proliferării.

B. Proteinkinaze cu sau fără funcţie de receptor

Aproximativ 30% dintre oncogenele descrise până în prezent codifică proteine cu activitate kinazică, în marea lor majoritate receptori ai factorilor de creştere. Moleculele acestor oncoproteine sunt capabile să declanşeze — în absenţa liganzilor specifici — fosforilarea reziduurilor tirozinice proprii sau ale altor kinaze. Rezultatul îl constituie furnizarea permanentă şi necontrolată de semnale intracelulare care promovează proliferarea nelimitată. De exemplu, gena erbB1 specifică domeniul kinazic al receptorului pentru factorul de creştere epidermal (EGFR), gena fms — receptorul factorului stimulator al formării de colonii 1

(CSF1 R), iar gena kit — receptorul factorului de creştere a macrofagelor (MGFR).

Alte oncogene codifică proteinkinaze fără funcţie de receptor, localizate pe faţa internă a membranei plasmatice (src, lck, yes, fes), sau la nivelul nucleului (abl). Familia tirozinkinazelor asemănătoare cu src (src-like) (crs, yes, lck, toate conţinând cel puţin un domeniu cu omologie src-SH2 sau SH3) include amplificatori de semnal. Stimulată de un receptor, o astfel de kinază fosforilează sute de molecule ale substratului. În plus, kinaza Lck este asociată receptorilor CD4 şi CD8 de pe suprafaţa limfocitelor T, activitatea ei fiind reglată de variatele interacţiuni celulare mediate de aceşti receptori.

Un deosebit interes prezintă faptul că, deşi fosforilarea tirozinei constituie un eveniment critic în controlul creşterii celulare, fosfotirozina este extrem de rar întâlnită în celulele normale. În schimb, în celulele neoplazice cantitatea de fosfoproteine este foarte mare, datorită activării oncogenice realizată prin unul dintre următoarele mecanisme:

a) hiperexprimarea oncoproteinelor, adică sinteza în cantităţi excesive a tirozinkinazelor cu activitate normală (în multe cancere ovariene sau mamare au fost decelate copii multiple ale genei c-erbB care determină sinteza unui număr impresionant de molecule receptor cu activitate tirozinkinazică) (figura 2.4);

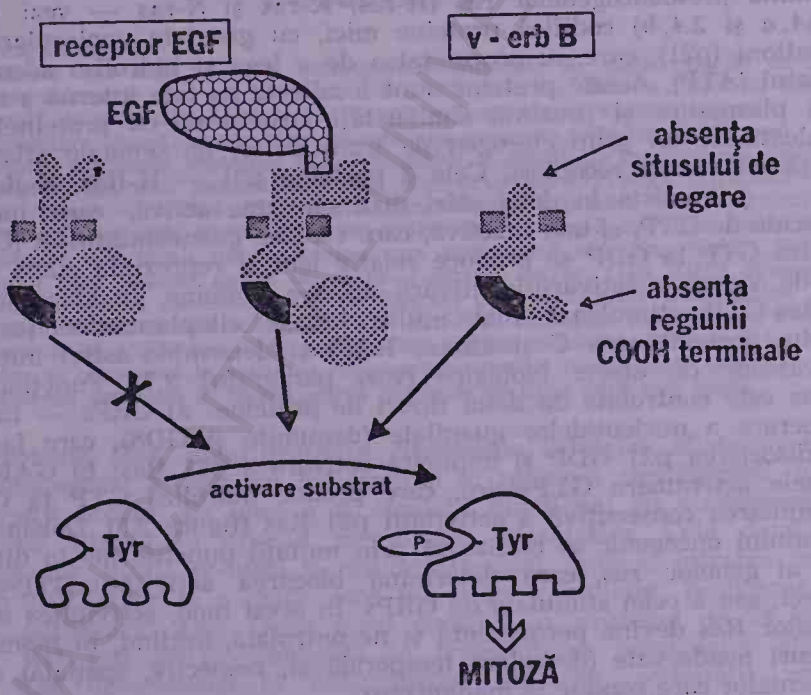


Fig. 2.4. Alterarea receptorilor pentru factorii de creştere poate determina transformarea celulară.
Oncogena virală v-erbB este forma trunchiată la ambele capete a protooncogenei c-erbB care codifică receptorul pentru factorul de creştere epitelial (EGFR). Alterările receptorului determină activarea permanentă a regiunii kinazice (zona plină), realizată în absenţa ligandului specific. În unele tumori gena c-erbB suferă aceleaşi modificări, ca urmare a inserţiei virale.

b) mutații care cresc activitatea enzimatică prin alterarea structurală a regiunilor cu rol în fosforilare din moleculele oncoproteinelor (de exemplu, oncoproteina pp60v-src codificată de oncogena v-src se deosebește de corespondenta ei codificată de protooncogena c-src printr-o activitate enzimatică mai intensă datorată substituției cu fenilalanină a unei tirozine din capătul carboxiterminal);

c) relocarea intracelulară a oncoproteinei, cu implicita apariție a unei activități tirozinkinazice ectopice (pentru a avea efect transformant, proteina nucleară Abl trebuie să acționeze la nivelul membranei plasmatice).

C. Receptori fără activitate tirozinkinazică

Unicul exemplu disponibil este cel al protooncogenei c-mos, care codifică receptorul angiotensinei; efectele intracelulare se datorează stimulării proteinelor G și, consecutiv, a fosfolipazei C, proteinkinazei C și a adenilatciclazei. Forma oncogenică a fost izolată recent, prin transfer genic, dintr-un carcinom uman.

D. Proteine G membranare (GTP-aze membranare)

Familia protooncogenelor ras (H-ras, K-ras și N-ras — vezi tabelele 2.4, *a* și 2.4, *b*) codifică proteine mici, cu greutate moleculară de 21 kDaltoni (p21), care au proprietatea de a lega și hidroliza adenozintrifosfatul (ATP). Aceste proteine sunt localizate pe fața internă a membranei plasmatice și prezintă similarități structurale cu proteinele G, care alcătuiesc un grup eterogen de transductori de semnale aflați în legătură cu variați receptori. Cele 3 proteine p21 — H-Ras, K-Ras și N-Ras — pot exista în două stări distincte: una activă, care include o moleculă de GTP, și una inactivă, care conține guanozindifosfat (GDP). Hidroliza GTP la GDP se produce relativ lent și reprezintă etapa limitantă de viteză a activării/inactivării acestor proteine. În stare activă, p21 Ras-GTP stimulează mai multe kinaze citoplasmatice (ca, de exemplu, proteinkinaza C și kinaza RAF) și determină astfel inițierea unei cascade de efecte biologice (vezi paragraful 2.7). Funcționarea p21 Ras este controlată de două tipuri de proteine: a) GRFs — factori de eliberare a nucleotidelor guanilate (denumite și GDS), care favorizează disocierea p21 GDP și implicita activare a p21 Ras; b) GAPs — proteinele activatoare GTP-azice, care produc hidroliza GTP la GDP, cu diminuarea consecutivă a activității p21 Ras (figura 2.5). Dobândirea potențialului oncogenic se realizează prin mutații punctiforme în diferiți codoni ai genelor ras, care determină blocarea activității GTP-azice intrinseci, sau a celei stimulate de GRPs. În acest mod, activitatea oncoproteinelor Ras devine permanentă și necontrolată, inițiind, în momente sau locuri neadecvate (dereglare temporală și, respectiv, spațială) seria evenimentelor care conduc la malignizare.

E. Serin/treonin kinaze citoplasmatice

Genele c-mos și c-raf codifică proteine citoplasmatice care fosforilează reziduurile de serină și treonină ale diferitelor substraturi intracelulare.

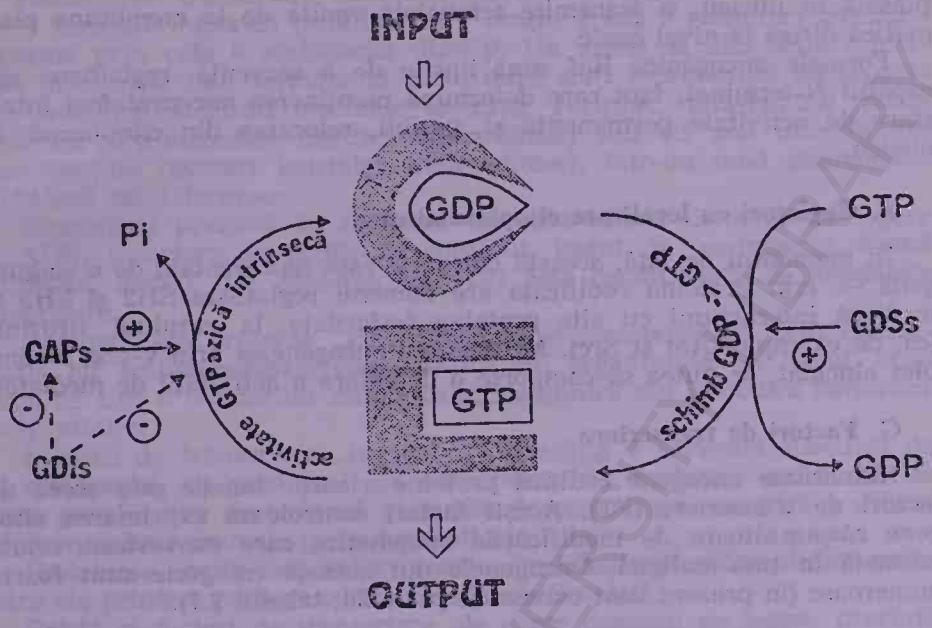


Fig. 2.5. Ciclul ras.
Proteinele Ras sunt GTPaze membranare prezente în toate tipurile de celule ale organismelor de pe întreaga scară filogenetică. Forma inactivă leagă o moleculă de guanozin-difosfat (GDP); sub influența unor variate semnale extracelulare (input) se produce schimbul cu guanozin trifosfat (GTP) care determină activarea proteinei Ras. Rezultatul îl constituie modificarea diferitelor substraturi din aval (output). Datorită unei activități GTPazice intrinseci — dar foarte reduse — a Ras GTP, are loc inactivarea proteinei Ras (hidroliza GTP la GDP). În celulele normale, forma activă are o durată de viață foarte scurtă, ca urmare a acțiunii unor proteine care stimulează hidroliza (GAP). Există și proteine care măresc duata de viață a formei active: GDI (GDP Dissociation Inhibitors) inhibă disocierea GTP de Ras, iar GDS (GTP/GDP Dissociation Stimulators) stimulează schimbul GDP cu GTP. Mutațiile punctiforme localizate în codonii 12, 13, 59 sau 61 ai genelor Ras inhibă activitatea GTPazică intrinsecă, precum și răspunsul la acțiunea reglatorilor negativi (GAP), determinând menținerea proteinei în forma activă perioade de timp mult mai lungi.

Proteina Mos, identificată în citoplasma celulelor aflate în meioză, s-a demonstrat a avea un rol esențial în reglarea desfășurării normale a acestui proces. Ea pare a fi corelată funcțional cu numeroase oncoproteine situate la nivelul membranei plasmatice. Cele două forme oncogenice, virală (v-mos) și celulară (c-mos), grăbesc intrarea celulelor în mitoză, chiar și a celor care nu și-au completat replicarea ADN (vezi paragraful 2.8). Gena c-raf codifică o proteină de 74 kDaltoni (p74 Raf sau Raf1), implicată în transmiterea semnalelor atât prin p21 Ras (inactivarea ei determinând blocarea activității mitogene a p21 Ras), cât și prin receptorii pentru factorul de creștere epidermal (EGFR) și pentru cel derivat din trombocite (PDGFR).

Efectul biologic al Raf1 constă în stimularea mitogenezei prin două activități distincte: 1) fosforilează proteinkinaza activată de mitogen (MAPK), iar aceasta fosforilează, la rândul ei, altă kinază aflată în relație cu factorii de transcriere a genelor implicate în desfășurarea mitozei; 2) după stimulare, Raf1 își schimbă sediul, deplasându-se din cito-

plasmă în nucleu, și transmite semnalele venite de la membrana plasmatică direct la nivel genic.

Formele oncogenice Raf sunt lipsite de o secvență reglatoare din capătul N-terminal, fapt care determină menținerea oncoproteinei într-o stare de activitate permanentă și, posibil, relocarea din citoplasmă în nucleu.

F. Reglatori cu localizare citoplasmatică

În momentul de față, această categorie este reprezentată de o singură genă — crk. Proteina codificată are domenii reglatoare SH2 și SH3 și mediază interacțiuni cu alte proteine fosforilate la reziduul tirozinic (ca, de exemplu, Abl și Src). Mecanismul oncogenezei prin v-crk, incomplet elucidat, ar putea să comporte o dereglare a activității de mediator.

G. Factori de transcriere

Numeroase oncogene codifică proteine a căror funcție este aceea de factori de transcriere (FT). Acești factori controlează exprimarea altor gene răspunzătoare de modificările epigenetice care convertesc celula normală în una malignă. Oncogenele din această categorie sunt foarte numeroase (în prezent sunt cunoscute peste 20; tabelul 2.7).

Tabelul 2.7

Oncogene care codifică factori de transcriere[1]

A. Leucine zipper (LZ)
fos
jun
B. Zinc finger (ZF)
erb A
RARA
PML
C. LIM motiv
ttg 1, ttg 2
D. Homeobox
pbx
Hox 11, Hox 23, Hox 24
E. Helix-loop-helix (HLH)
myc, N-myc, L-myc
lyl 1
tal 1, tal 2
E2A
F. Altele
myb
rel

[1] Sunt prezentate doar genele a căror activitate transformată *in vivo* sau *in vitro* a fost cert demonstrată.

În general, un factor de transcriere este alcătuit din două domenii funcționale, unul pentru legare la ADN, și altul pentru activarea transcripției. Au fost descrise mai multe familii de FT, dar lista acestora este departe de a fi închisă.

Factorii de transcriere denumiţi „fermoare leucinice“ („leucine zipper“) sunt alfa-helixuri protidice care conţin 4 sau 5 reziduuri leucinice separate prin câte 6 aminoacizi diferiţi. Un astfel de alfa-helix constituie jumătatea unui fermoar ai cărui dinţi sunt reprezentaţi de repetările leucinice. Întrucât leucinele se atrag reciproc, alfa-helixul poate dimeriza cu o moleculă identică (homodimer) sau cu una diferită, dar care conţine repetări leucinice (heterodimer), într-un mod asemănător închiderii unui fermoar.

Monomerii prezintă în regiunea aminoterminală domenii de legare la ADN, caracterizate printr-un conţinut bogat în aminoacizi bazici (arginină, lizină), dar cuplarea cu ADN este condiţionată de prealabila dimerizare.

Aşa-numitele proteine „zinc fingers“ se caracterizează prin conformaţia lor tridimensională care rezultă din organizarea în jurul unui atom de zinc a repetărilor cisteinice şi histidinice din structura lanţurilor polipeptidice.

Factorii de transcriere „homeobox“ prezintă o secvenţă specifică de 61 aminoacizi, cu grad înalt de conservare în evoluţie, codificată de toate genele care controlează planurile de organizare somatică a diferitelor organisme animale (gene homeotice).

Proteinele „helix-loop-helix“ conţin două helixuri polipeptidice unite între ele printr-o regiune cu structură nehelicoidală.

Există şi factori de transcriere ale căror domenii de legare prezintă conformaţii particulare, fără omologie cu alte secvenţe cunoscute (vezi tabelul 2.7).

Protooncogenele c-jun şi c-fos codifică două proteine nucleare (Jun şi Fos) care se asamblează formând factorul de transcriere heterodimeric AP1 (Fos-Jun). Acesta mediază transcrierea indusă de esterii de forbol, controlând expresia genelor implicate în proliferarea celulară, ca urmare a legării sale la o secvenţă nucleotidică specifică, denumită TRE (element de răspuns la TPA, care este un ester de forbol). Atât c-jun cât şi c-fos fac parte din clasa genelor exprimate în primele etape ale ciclului celular, şi a căror transcriere este indusă rapid de factori extracelulari (factori de creştere sau neurotransmiţători).

Faţă de corespondenţele lor celulare normale, oncogenele virale v-fos şi v-jun sunt profund modificate prin mutaţii punctiforme şi deleţii multiple. Malignizarea se realizează prin efecte cantitative şi calitative. Efectele cantitative decurg din dimerizarea oncoproteinelor v-Fos şi v-Jun cu proteinele normale omoloage, ceea ce determină blocarea activităţii ultimelor prin acţiune dominant negativă; ca urmare, AP 1 devine inactiv sau îşi reduce substanţial activitatea, rezultatul fiind modificarea nivelului proteinelor specificate de genele a căror transcriere este reglată de complexul Fos-Jun; modul în care aceste variaţii cantitative determină malignizarea este necunoscut, dar ele sunt detectate în toate celulele transformate prin fos sau jun. Efectele calitative decurg din faptul că oncoproteinele Fos şi Jun acţionează asupra altor gene decât cele controlate în mod normal de AP1, determinând sinteza unor proteine diferite de cele prezente în celulele normale.

Familia genelor pentru receptorii hormonilor steroidieni şi tiroidieni codifică factori de transcriere de tipul „zinc fingers“, deosebit de versatili funcţional. La nivel citoplasmatic ei au rol de receptori hormonali; interacţiunea cu hormonii determină activarea receptorilor şi transferul

complexului receptor-hormon în nucleu, unde acționează ca elemente reglatoare ale unor gene specifice.

Protooncogena c-erbA codifică o proteină (ErbA) cu rol de receptor al hormonilor tiroidieni, iar protooncogena rara — un factor de transcriere care leagă, la nivel citoplasmatic, acidul retinoic. În nucleu, ambele proteine se atașează la o secvență nucleotidică specifică, denumită HRE (element de răspuns la hormoni), localizată în elementele reglatoare ale unui număr important de gene implicate în diferențierea celulară, activându-le transcrierea. ErbA și RARA realizează, totodată, și blocarea activității genelor controlate de complexul AP1, pe care îl inactivează specific (figura 2.6).

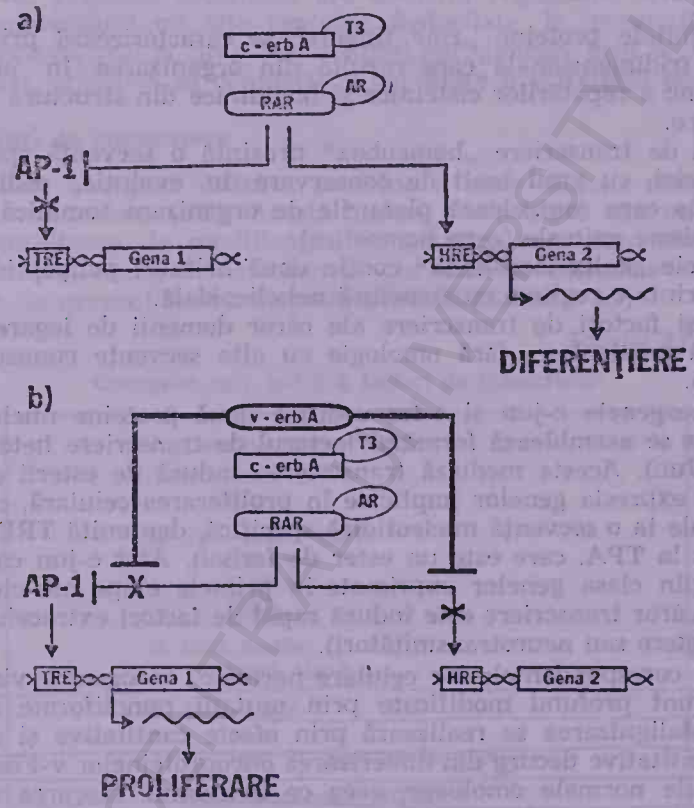


Fig. 2.6. Efectele biologice ale oncoproteinei v-erbA.
(a) În celula normală receptorul pentru T3 (c-erbA) și receptorul pentru acidul retinoic (RAR) activează transcrierea genelor care conțin la nivelul promotorului secvența HRE (hormone response element) și, prin inhibarea factorului de transcriere AP-1, blochează exprimarea genelor care conțin în regiunea reglatoare secvențe de tip TRE (TPA response element). Ca urmare, celula va opta pentru realizarea programului de diferențiere.
(b) În celula malignă proteina v-erbA antagonizează ambele efecte exercitate de receptorii c-erbA și RAR. Rezultatul îl constituie stimularea proliferării și blocarea diferențierii. Se observă că v-erbA funcționează în absența interacțiunii cu ligandul specific T3. Simboluri: AR — acid retinoic; RAR — receptorul pentru acid retinoic; săgeata — activare; bara — blocare.

Oncogena virală v-erbA se deosebește de gena omoloagă celulară printr-o serie de mutații punctiforme și prin variate deleții ale unor secvențe oligonucleotidice de la ambele capete ale genei. Consecințele acestor modificări sunt: (a) scăderea afinității oncoproteinei v-Erb pentru triiodotironină; proteina anormală va funcționa independent de prezența hormonilor tiroidieni, dar va fi lipsită de capacitatea de a activa genele țintă sau de a inactiva complexul transcripțional Fos-Jun; b) exercitarea unui efect dominant negativ asupra receptorului normal c-ErbA, care va deveni incapabil să mai inhibe factorul de transcriere AP1 (vezi figura 2.6).

Oncogena RARA, rezultată prin fuziunea protooncogenei corespunzătoare de pe cromozomul 17 cu o genă localizată pe cromozomul 15 (PML), determină, de asemenea, sinteza unui factor de transcriere. Prezentă la toți bolnavii cu leucemie acută promielocitară M3, proteinkinaza cu activitate transcripțională PML-RARA se caracterizează prin pierderea afinității pentru acidul retinoic și exercită un efect dominant negativ asupra proteinei normale RARA.

Consecințele ultime ale alterării protooncogenelor c-erbA și RARA sunt reprezentate de stimularea proliferării, concomitent cu blocarea diferențierii celulare; aceste fenomene se fac răspunzătoare de apariția eritroblastozei și, respectiv, a leucemiei acute promielocitare.

Oncogena v-rel este versiunea trunchiată a genei c-rel, rezultată prin delecția regiunii care codifică extremitatea carboxiterminală a proteinei v-Rel; jumătatea aminoterminală, care conține domeniile de legare la ADN și pe cele de dimerizare, s-a dovedit a avea un rol important în malignizare.

Modul în care oncogenele v-myc și v-myb funcționează determinând transformarea malignă este, încă, puțin cunoscut. Se presupune că activarea protooncogenelor se însoțește de modificări subtile în recunoașterea genelor țintă; urmarea este că intervenția reglatoare se va exercita ilegitim asupra altor secvențe nucleotidice decât cele reprezentând țintele specifice. De menționat că în numeroase tumori sunt detectate frecvent copii multiple ale genelor myc sau myb (amplificare genică): activitatea lor generează cantități exagerate de proteine Myc sau Myb care realizează supraexprimarea genelor țintă.

2.2.5. ACTIVAREA PROTOONCOGENELOR SE REALIZEAZĂ PRINTR-UN NUMĂR LIMITAT DE MECANISME

Activarea celor mai mult de 100 de protooncogene identificate până în prezent și care sunt potențial implicate în etiopatogenia a peste 100 de cancere dierite pare a se realiza prin intervenția a doar 4 mecanisme: inserția virală, rearanjările cromozomiale, mutațiile punctiforme și amplificarea genică. De notat că, deși o protooncogenă poate fi activată prin mai multe mecanisme (vezi figurile 2.7, 2.8, 2.10, 2.11), într-o aceeași tumoră prezența oncogenelor este, de regulă, rezultatul acțiunii unui singur mecanism. S-au descris, totuși, situații în care apariția unei oncogene s-a datorat intervenției asupra unei aceleiași protooncogene a mai multor mecanisme activatoare.

2.2.5.1. Inserţia virală

Inserţia virală reprezintă integrarea în cromozomii celulei gazdă a genomului viral, sub formă de provirus (ADN linear). Integrarea este aleatorie, în sensul că se produce în regiuni genomice variate şi care diferă de la o celulă la alta. În funcţie de tipul virusului inserat se descriu două situaţii:

a) Retrovirusii acut transformanţi şi virusii transformanţi ADN conţin în genomul lor oncogene (pe care le-au capturat din genomul celulelor parazitate anterior — retrovirusii — sau fără corespondent celular — virusii ADN). Ulterior inserţiei, aparatul transcripţional al celulei gazdă copiază oncogenele virale care vor fi apoi traduse în oncoproteine; acestea, prin mecanisme diferite, vor interfera cu programele vitale ale celulei gazdă (de creştere, supravieţuire sau diferenţiere).

Când o protooncogenă este capturată de un retrovirus, ea poate fi activată prin modificări calitative sau cantitative. Modificările calitative constau în alterarea secvenţei nucleotidice a genei (mutaţii punctiforme, deleţii, inserţii etc.), cu implicita alterare a funcţiei proteinei pe care o codifică. Modificările cantitative decurg din amplasarea protooncogenei sub influenţa puternicilor promotori şi intensificatori virali care determină producerea, în cantităţi exagerate, a proteinei corespunzătoare, normală structural. Prin infectarea unei noi celule, retrovirusul purtător al oncogenei declanşează seria evenimentelor care conduc la malignizare. Cele două tipuri de activare nu se exclud reciproc: un exemplu tipic este cel a virusului MC 29, al cărui genom codifică un singur polipeptid de 110 k Daltoni (un hibrid între proteina virală Gag şi proteina celulară Myc) (figura 2.7); integrarea genomică a acestui virus este urmată de dezvoltarea unor variate neoplazii la păsări şi mamifere (de exemplu, limfomul Burkitt). Printr-un mecanism similar funcţionează şi oncogenele prezentate în tabelul 2.4, a.

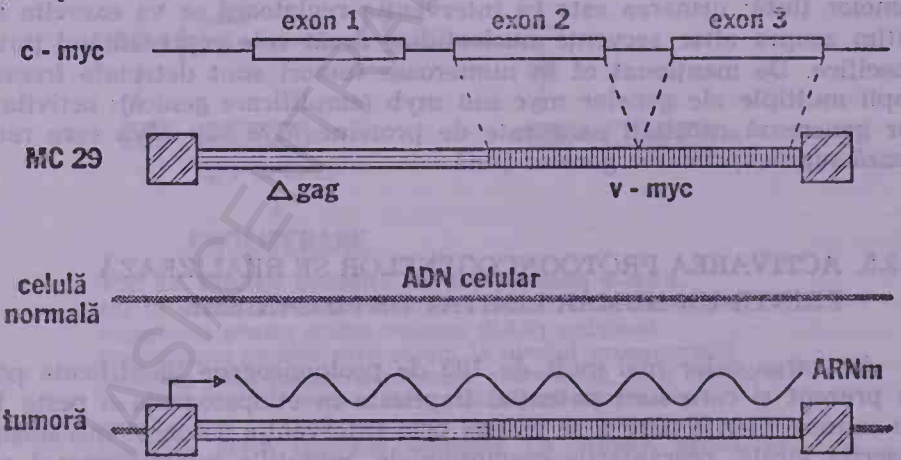


Fig. 2.7. Activarea protooncogenelor prin inserţie virală.
Integrarea retrovirusului MC29 la nivelul protooncogenei c-myc este urmată de inserţia exonilor 2 şi 3 ai c-myc în genomul viral care pierde însă genele env şi pol. MC29 devine un retrovirus acut transformant. În cazul unei infecţii ulterioare, integrarea în genomul celulei gazdă este urmată de transcrierea genelor virale Δgag (gena gag modificată) şi oncogena v-myc. Celula infectată sintetizează factorul de transcriere Myc care dereglează expresia genelor implicate în proliferare şi diferenţiere.

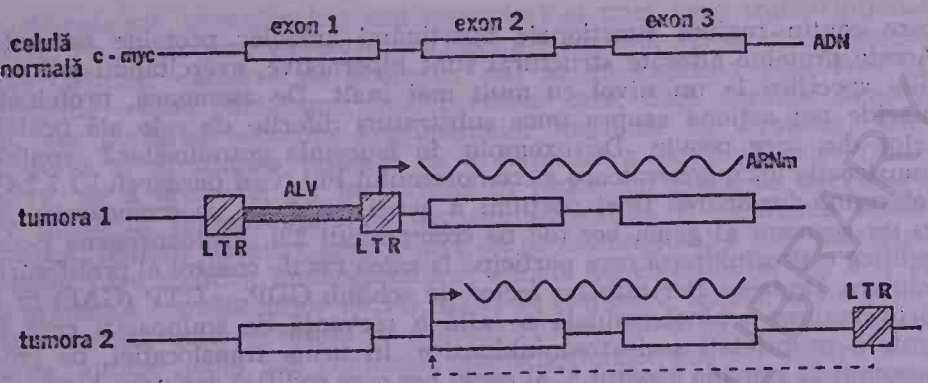


Fig. 2.8. Activarea protooncogenelor prin inserţie mutaţională.
Integrarea virusului ALV (avian leukosis virus) care nu conţine oncogene se realizează la nivelul protooncogenei c-myc şi determină exprimarea acesteia sub influenţa elementelor de reglare din regiunea LTR. Sinteza proteinei Myc, care în mod normal nu este prezentă în celulă, dereglează programele de creştere şi dezvoltare (tumora 1). La acelaşi efect conduce inserţia — la distanţă de c-myc — a unui fragment al LTR din ALV care influenţează promotorul natural c-myc (tumora 2). Exonul 1 al genei c-myc este necodificant şi, de aceea, tumorile vor sintetiza o proteină Myc normală structural.

Spre deosebire de retroviruşi, viruşii transformanţi ADN conţin în genomul lor gene proprii care, transcrise în nucleul celulei gazdă, exprimă proteine care blochează activitatea normală a unor factori celulari cu rol antiproliferativ (vezi paragraful 1.4).

b) viruşii ADN sau ARN nepurtători de oncogene intervin în tumorigeneză prin mecanismul denumit mutaţie prin inserţie, şi care se explică prin integrarea aleatorie a provirusului în apropierea sau în chiar interiorul unei protooncogene. Activarea protooncogenei este consecinţa fie a alterărilor structurale, fie a dereglării controlului genic sub influenţa intensificatorilor sau a promotorilor virali. Unele dintre aceste elemente reglatoare virale sunt atât de puternice încât pot determina activarea unei protooncogene aflate la distanţă de mii de perechi de nucleotide faţă de locul integrării, şi pot funcţiona chiar în lipsa restului de genom viral. Acest mecanism al oncogenezei este comun viruşilor prezentaţi în tabelul 2.3 şi contribuie la activarea a numeroase protooncogene (unele dintre acestea sunt prezentate în tabelul 2.6). Protooncogena myc, de exemplu, îşi poate dobândi activitate oncogenică şi prin mecanismul mutaţiei inserţionale (figura 2.8).

2.2.5.2. Rearanjările cromozomiale neîntâmplătoare

Sub această denumire sunt reunite aberaţiile structurale ale cromozomilor care modifică ordinea normală a amplasării genelor pe cromozomi. Reprezentative sunt translocaţiile, prin care se realizează schimburi de material genetic (gene) între doi sau mai mulţi cromozomi, omologi sau neomologi.

Translocaţiile pot conduce la activarea protooncogenelor prin două mecanisme:

a) Formarea de gene hibride prin fuzionarea unor secvenţe genice de pe cromozomi diferiţi. Prin transcriere şi traducere apar proteine himerice

care conţin regiuni funcţionale aparţinând ambelor proteine normale. Aceste proteine alterate structural sunt hiperactive, exercitându-şi funcţiile specifice la un nivel cu mult mai înalt. De asemenea, proteinele hibride pot acţiona asupra unor substraturi diferite de cele ale proteinelor din care provin. De exemplu, în leucemia granulocitară cronică, translocaţia 9;22, generatoare a cromozomului Ph^1 (vezi paragraful 1.7.1.4), determină fuzionarea unei porţiuni a genei c-abl (de pe cromozomul 9) cu un segment al genei bcr (de pe cromozomul 22). Protooncogena c-abl codifică o tirozinkinază care participă la calea ras de control al proliferării celulare. Proteina Bcr este un factor de schimb GDP⟶GTP (GAP) în a cărui regiune aminoterminală se află o secvenţă de aminoacizi care îi conferă proprietăţi serin/treoninkinazice. În urma translocaţiei, pe cromozomul 22 rămâne capătul 5′ al genei bcr care codifică regiunea kinazică, acesteia alăturându-i-se cea mai mare parte a genei c-abl, a cărei funcţie enzimatică este integral păstrată. Proteina himerică Bcr-Abl (p210) este mai mare decât proteinele Abl şi Bcr normale, şi este dotată cu o activitate tirozinkinazică mult mai intensă, ca urmare a reţinerii ambelor regiuni kinazice ale celor două secvenţe aminoacidice (figura 2.9). Consecinţa este stimularea excesivă a substraturilor normale ale proteinei Abl şi/sau Bcr. De reamintit că în leucemiile limfoblastice acute Ph^1 pozitive, amplasarea punctului de rupere de la nivelul genei bcr este diferită, hibridul bcr-abl determinând sinteza unei proteine mai mici (p190), dar având, de asemenea, activitate kinazică crescută. Nu s-a găsit încă o explicaţie satisfăcătoare pentru modul în care diferenţele între p210 şi p185 se fac răspunzătoare de caracterul cronic sau acut al procesului leucemic.

b) Deplasarea în totalitate (fără producerea de alterări structurale) a unei protooncogene într-o altă regiune genomică, în care va stabili relaţii

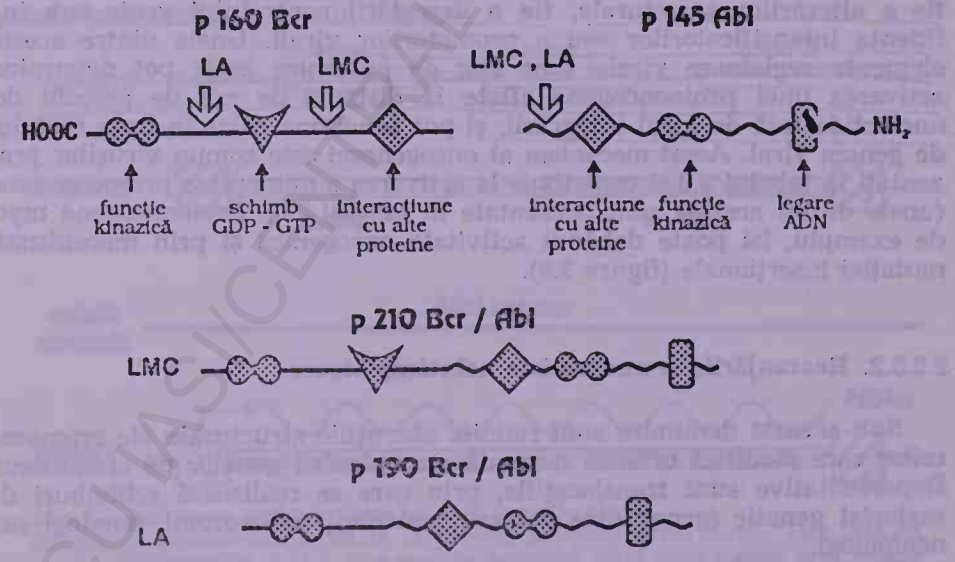


Fig. 2.9. Domeniile funcţionale ale proteinelor normale p160BCR şi p145ABL şi domeniile oncoproteinelor p210 BCR/ABL şi p190 BCR/ABL din celulele cu t(9; 22).
Punctele de rupere din leucemiile acute (LA) şi din leucemia mieloidă cronică (LGC) sunt indicate prin săgeţile albe.

funcţionale cu intensificatori sau promotori ai unei gene transcripţional active. Protooncogena va deveni, la rândul ei, activă, determinând sinteza unei cantităţi excesive de proteine, sau se va exprima inadecvat în ontogenia celulei purtătoare. Apar proteine care, deşi normale structural, vor perturba secvenţa evenimentelor implicate în creşterea, diferenţierea şi diviziunea celulară ca urmare fie a dezechilibrelor cantitative, fie a prezenţei lor inoportune în raport cu etapa de dezvoltare. De pildă, în limfoproliferările maligne cu celule B (leucemie limfoblastică, limfom Burkitt), gena c-myc de pe cromozomul 8 este juxtapusă genelor care codifică imunoglobuline, situate pe cromozomii 14, 2 şi 22 ca urmare a translocaţiilor t(8;14), t(2;8) şi, respectiv, t(8;22). Gena c-myc care, normal, este represată în celulele B care şi-au completat diferenţierea, ajunge astfel sub controlul intensificatorilor genelor pentru imunoglobuline; aceştia vor determina activarea sintezei proteinei Myc care va stimula, într-un moment ontogenetic inadecvat, expresia unor gene implicate în proliferarea celulară (figura 2.10). În proliferările maligne cu celule T, un mecanism identic activează numeroase protooncogene care codifică factori de transcriere (tal1, tal2, ttg1, ttg2); în aceste cazuri, punctele de rupere sunt localizate la nivelul regiunilor cromozomiale

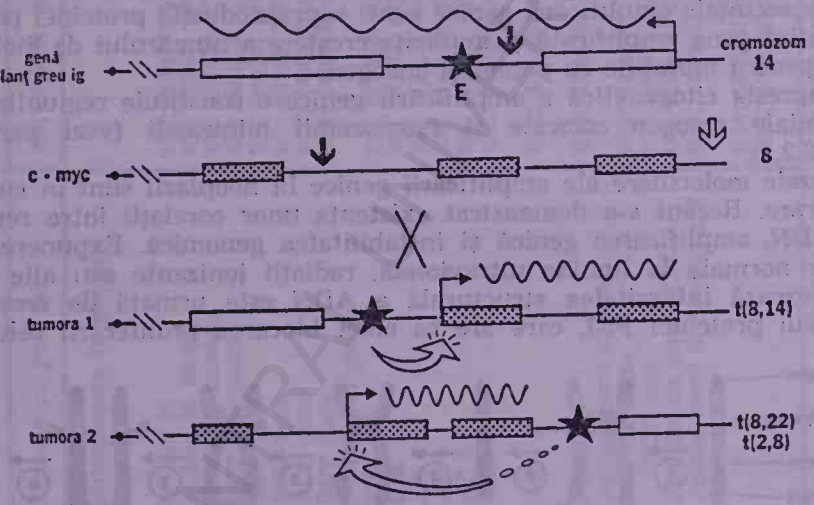


Fig. 2.10. Activarea protooncogenelor prin translocaţii cromozomiale. Numeroase proliferări maligne ale limfocitelor B prezintă translocaţii care determină aducerea în juxtapoziţie a genei c-myc cu genele imunoglobulinelor de pe cromozomii 14 (IGH), 2 (IGL kappa) şi 22 (IGL lambda). Ca urmare a translocaţiilor, gena c-myc — în mod normal inactivă în limfocitele B diferenţiate — este menţinută în stare de activitate transcripţională de către intensificatorul genelor IG (notat cu litera E). Este prezentată şi diferenţa dintre translocaţia standart t (8;14) (tumora 1) şi variantele t (2;8) şi t (8;22) (tumora 2). În translocaţia standard punctul de rupere la nivelul genei c-myc se află între primul şi al doilea exon (săgeata neagră groasă) şi, ca urmare, pe cromozomul 14 sunt translocaţi ultimii doi exoni care vor fi amplasaţi în apropierea intensificatorului genei IGH. În t (2;8) şi t (8;22) ruptura se situează după ultimul exon al genei c-myc (săgeata albă groasă) care rămâne pe cromozomul 8; la acest nivel vor fi repoziţionate genele IGL de pe cromozomii 2 şi 22, împreună cu intensificatorii proprii. În toate cele trei situaţii efectul este acelaşi; exprimarea inadecvată (temporal şi cantitativ) a oncoproteinei MYC.

14q11 şi 7q35, unde sunt situate situsurile lanţurilor alfa şi delta ale receptorilor celulelor T (RCT) şi, respectiv, situsurile lanţurilor beta şi gamma. Elementele reglatoare din aceste regiuni determină exprimarea aberantă a oncogenelor translocate în vecinătatea lor.

Deosebirea dintre cele două mecanisme rezidă, aşadar, în faptul că, în timp ce primul alterează calitativ oncogenele, al doilea produce exclusiv modificări de ordin cantitativ.

În tabelul 2.8 sunt prezentate câteva dintre translocaţiile din hemopatiile maligne care au fost caracterizate în termeni moleculari.

2.2.5.3. Amplificarea genică

Creşterea de zeci sau sute de ori a numărului de copii ale unei gene (amplificare genică) este rezultatul unui proces complex care începe prin duplicarea unei secvenţe ADN; multiplicarea ulterioară a numărului de repetări ale secvenţei duplicată iniţial se realizează prin evenimente succesive de „crossing over" somatic inegal (recombinare ilegitimă a cromatidelor surori în cursul replicării ADN) (figura 2.11).

Consecinţele amplificării genice sunt: supraproducţia proteinei pe care o codifică gena amplificată şi implicita creştere a numărului de molecule ţintă pentru mutaţiile cu potenţial oncogen.

Expresia citogenetică a amplificării genice o constituie regiunile cromozomiale omogen colorate şi cromozomii minusculi (vezi paragraful 1.2.2.3).

Bazele moleculare ale amplificării genice în neoplazii sunt în curs de descifrare. Recent s-a demonstrat existenţa unor corelaţii între replicarea ADN, amplificarea genică şi instabilitatea genomică. Expunerea celulelor normale la lumina ultravioletă, radiaţii ionizante sau alte noxe care lezează integritatea structurală a ADN este urmată de creşterea nivelului proteinei P53, care are ca efect blocarea proliferării celulare;

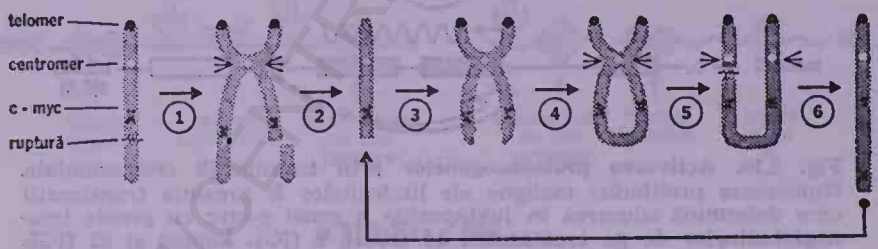


Fig. 2.11. Activarea oncogenelor prin amplificare.
Amplificarea genică prin ciclul „rupere-fuziune".
(1) Cromozomul 8 prezintă o ruptură situată distal de locusul c-myc; datorită unor anomalii genetice adiţionale celula intră în faza S înainte de repararea leziunii cromozomiale.
(2) Una din celulele fiice primeşte cromozomul fără telomer.
(3) În următoarea fază S se produce duplicarea cromozomului amputat.
(4) Capetele rupte ale cromatidelor surori fuzionează.
(5) Datorită migrării divergente a cromatidelor surori în anafază se produce o nouă ruptură.
(6) O celulă fiică primeşte un cromozom lipsit de telomer dar care poartă două gene myc. Ciclul se reia la fiecare diviziune, conducând la apariţia de copii multiple, vizibile ca regiuni omogen colorate; în cazul exciziei regiunilor amplificate, în celule apar cromozomi minusculi.

Tabelul 2.8

Protooncogenele activate prin translocații în hemopatiile maligne

Tipul genei	Funcție	Alterarea moleculară	Translocația	Boala (procent bolnavi)
Tirozinkinaze abl	Transducție semnale	Fuziune cu gena bcr	t(9; 22)(q34; q11)	LGC (>95%) LAL (5—20%)
Elemente de control transcriere myc	Transcriere genică	Juxtapunere la genele:		
		ig lanț H	t(8; 14)(q24; q32)	LB (100%)
		ig lanț K kappa	t(2; 8)(p12; q24)	
		ig lanț L lambda	t(8; 22)(q24; q11)	
tal 1		RCT alfa/delta	t(1; 14)(q32; q11)	LAL-T (15—25%)
tal 2		RCT beta	t(7; 9)(q35; p13)	LAL-T (<10%)
lyl 1		RCT beta	t(7; 9)(q35; p13)	LAL-T (<5%)
ttg 1		RCT delta	t(11; 14)(p15; q11)	LAL-T (<10%)
ttg 2		RCT delta	t(11; 14)(p13; q11)	LAL-T (<10%)
		Fuziune cu genele:		
E2A		PBX 1	t(1; 19)(q23; p13)	LAL-preB (<10%)
Can		Dek	t(6; 9)(p23; q34)	LAM
HRX		AF 4	t(4; 11)(q21; q23)	
		AF 9	t(9; 11)(p22; q23)	
		AF 6	t(6; 11)(q27; q23)	
		ENL	t(11; 19)(q23; p23)	LAL la copii (majoritatea cazurilor)
		AFX 1	t(11; X)(q23; q13)	LAM induse de tratament (majoritatea cazurilor)
RARA	Diferențiere	PML	t(15; 17)(q21; q21)	PML (100%)
HOX 11	Diferențiere și transcriere	Juxtapunere la gena		
		RCT delta	t(10; 14)(q24; q11)	LAL-T (7%)
		RCT beta	t(7; 10)(q35; q24)	LAL
AML 1		Fuziune cu gena MTG 8	t(8; 21)(q22; q22)	LAM M2 (40—60%)
bcl 1	Control ciclu celular	Juxtapunere la genele ig H	t(11; 14)(q13; q32)	Limfom centrocitic (>30%) LLC (2—5%)
bcl 2	Apoptoză		t(14; 18)(q32; q23)	Limfom folicular (>75%)
bcl 3	Inhibarea transcrierii		t(14; 19)(q32; q13)	LLC (<10%)

RCT=receptorul limfocitelor T; LGC=leucemie mieloidă cronică; LLC=leucemie limfoidă cronică; LAL-T=leucemie limfoblastică cu celule T; LAM=leucemie acută mieloblastică; PML=leucemie promielocitară.

celulele își încetează progresiunea din faza G1 în faza S a ciclului celular până în momentul în care se realizează repararea tuturor leziunilor ADN. În cazul inactivării genei p53 (vezi paragraful 2.1.4.) tranziția G1→S este accelerată, iar leziunile ADN produse în G1 nu mai pot fi reparate. Se declanșează astfel o serie de evenimente în care sunt implicați cromozomii alterați structural și genele purtate de aceștia; se produc cicluri succesive de „rupere-fuzionare" care au drept consecință atât accentuarea instabilității genomice, cât și creșterea numărului de copii genice dintr-o regiune cromozomială (vezi figura 2.11).

Protooncogenele activate prin amplificare fac parte din trei familii de gene: myc, erbB și ras. O aceeași genă poate să fie amplificată în mai multe tipuri de tumori, după cum un anumit tip de tumoră poate să conțină copii multiple aparținând mai multor familii de gene (tabelul 2.9).

Tabelul 2.9

Principalele protooncogene amplificate în tumorile umane

Gena	Tumora	Frecvența (%)
Familia myc		
c-myc	Carcinom col uterin	8—18
	Cancer de sân	11—12
	Cancer ovarian	12—38
	Carcinom scuamos anal	30
	Carcinom scuamos pulmonar	12—25
	Carcinoame scuamoase cefalice	9—17
	Carcinom gastric	4—10
N-myc	Neuroblastoame	10—31
	Rabdomiosarcom	31
	Retinoblastom	20
c-myc sau L-myc	Adenocarcinom pulmonar	2—11
	Carcinom pulmonar cu celule mari	7—10
c-myc/L-myc/ N-myc	Carcinom pulmonar cu celule mici	11—23
Familia erbB		
c-erbB1	Glioblastom	17—50
	Carcinom scuamos cefalic	10—19
c-erbB2	Cancer ovarian	20—33
	Cancer de sân	9—33
	Carcinom esofagian și gastric	5—13
Familia ras		
K-ras	Carcinom gastric	10
N-ras	Carcinoame scuamoase cefalice	30

Protooncogena N-myc este amplificată predominant în tumori de origine neurală sau neuroendocrină, L-myc — în carcinoame pulmonare, iar c-erbB1 — în carcinoamele esofagiene, ale capului și gâtului și în glioblastoame.

Deși semnificația amplificării genice nu este pe deplin clarificată, există temeiuri suficiente pentru a o incrimina ca factor determinant al

accelerării evoluției tumorilor. Amplificarea genică este cu mult mai frecvent observată în tumorile mari, cu grad redus de diferențiere, și care și-au dobândit capacitatea de metastazare. S-a evidențiat, de asemenea, o asociere strânsă între amplificarea genică și inactivarea genei p53 — eveniment tardiv în evoluția tumorală. Deoarece genele amplificate în neoplasme aparțin tuturor celor trei compartimente de semnalizare intracelulară (membrană plasmatică, citoplasmă și nucleu), este foarte probabil ca amplificarea și supraexprimarea unei astfel de gene să determine un răspuns mai eficient al celulei canceroase la nivelurile scăzute ale factorilor de creștere din mediu, asigurându-se în acest mod proliferarea celulelor maligne în condiții de mediu în care o celulă fără amplificări ale oncogenelor ar rămâne blocată în faza Go a ciclului celular.

2.2.5.4. Mutațiile genice

Mutațiile prezente în celulele neoplazice — răspunzătoare de activarea protooncogenelor — sunt de două tipuri: mutații punctiforme și deleții.

a) *Mutațiile punctiforme* sunt modificări ale unei singure perechi de baze azotate din secvența nucleotidică a unei gene și pot fi localizate în regiunile structurale, care specifică succesiunea aminoacizilor din lanțurile polipeptidice, sau în elementele reglatoare ale genelor, care controlează exprimarea regiunilor structurale.

Consecința mutațiilor în regiunile structurale este reprezentată de alterarea calitativă a produsului genic, în timp ce mutațiile în elementele reglatoare conduc la modificări ale cantității de proteine (figura 2.12).

Exemplul tipic de mutații în regiunile structurale îl constituie substituțiile unei singure baze azotate din codonii 12, 13, 59 sau 61 ai protooncogenelor ras. Activarea oncogenică se realizează prin următoarele substituții: glicina din pozițiile 12 sau 13 ale proteinei normale cu oricare alt aminoacid, exceptând prolina sau serina; alanina cu treonina în poziția 59; glutamina din poziția 61 cu alți aminoacizi, exceptând prolina sau acidul glutamic.

Aceste modificări blochează atât activitatea GTP-azică intrinsecă, cât și răspunsul la acțiunea proteinelor GAP, determinând menținerea în stare activată a Ras GTP o perioadă de timp mult mai lungă (vezi figura 2.5). Investigarea structurii tridimensionale prin cristalografie cu raze X a oncoproteinei Ras a arătat că aminoacizii substituiți (codificați de codonii alterați mutațional) sunt situați în regiunea de legare a GTP și că ei determină schimbarea conformației spațiale a întregii suprafețe care interacționează cu nucleotidele guanilice.

Semnificația epidemiologică și clinică a acestor mutații este majoră: peste 15% din totalitatea bolnavilor cu cancere poartă în tumori alterări ale unei singure baze azotate într-o oncogenă ras. În funcție de frecvența cu care sunt decelate mutațiile genelor ras, diferitele tumori umane se clasifică în două categorii: tumori în care se pot identifica frecvent mutații punctiforme ale uneia sau mai multor gene ras, și tumori în care

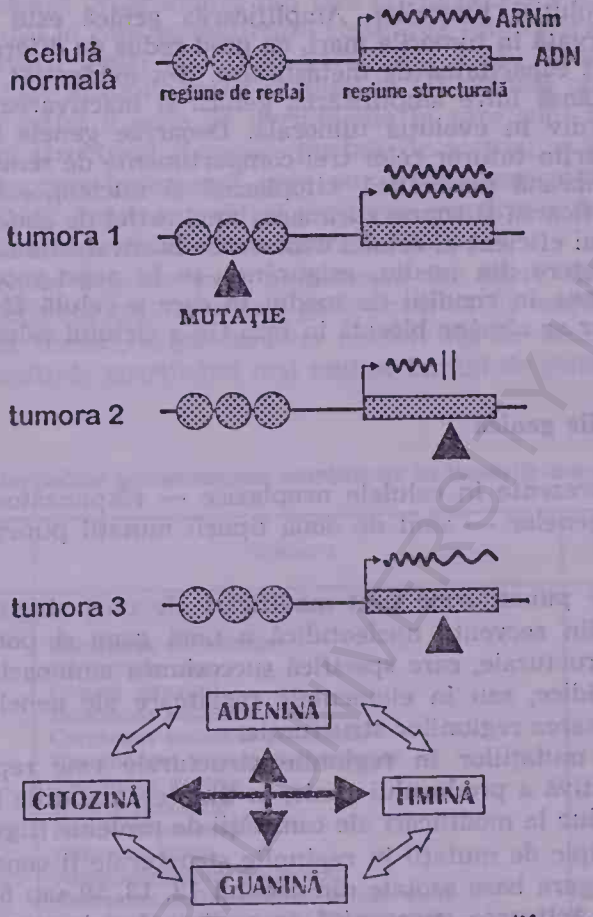


Fig. 2.12. Principalele tipuri de mutații punctiforme, localizarea genică și consecințele producerii lor. Sunt posibile 4 tipuri de tranziții (substituirea unei baze purinice cu o altă bază purinică, sau a unei baze pirimidinice cu o altă bază pirimidinică) și 8 tipuri de transversii (înlocuirea unei baze purinice cu una pirimidinică, sau invers). Indiferent de tip, mutațiile pot fi localizate în regiunea reglatoare (tumora 1) sau în regiunea structurală a unei protooncogene (tumora 2). În primul caz rezultă o alterare cantitativă a expresiei genetice, iar în celălalt — una calitativă.

aceste evenimente mutaționale sunt rare (tabelul 2.10); acestea din urmă conțin modificări genetice alternative care explică inițierea și progresiunea bolii. Deoarece mutațiile punctiforme ale oncogenelor ras sunt detectabile, în multe tumori, încă din fazele cele mai timpurii, se consideră că aceste modificări ar putea să constituie evenimente cu semnificație etiologică.

b) *Delețiile genice* (pierderi de secvențe nucleotidice din structura genei) au ca rezultat sinteza unor proteine trunchiate, cu activitate aberantă, sau dereglarea expresiei genei respective. Toate protooncogenele

Tabelul 2.10

Mutațiile punctiforme ale genelor RAS în tumorile umane

Tipul tumorii	Prevalență mutație	Gena afectată
Carcinom pancreas exocrin	>95%	K-ras
Cancer tiroidian nediferențiat	60%	H-ras
Carcinom folicular tiroidian	53%	K-ras
Adenom folicular tiroidian	50%	N-ras
Adenocarcinom colonic	60%	K-ras
Adenom colonic	58%	
Leucemie acută mieloblastică	30%	N-ras
Sindroame mielodisplazice	30%	
Leucemie mieloidă cronică	15%	N, K sau H-ras
Leucemie acută limfoblastică	10%	N, K sau H-ras
Carcinom ovarian	10%	N, K sau H-ras
Carcinom de sân	8%	N, K sau H-ras
Carcinom gastric	< 5%	N, K sau H-ras

care determină sinteza de receptori membranari cu activitate tirozinkinazică sunt activate ca urmare a unor deleții (vezi tabelele 2.4, b și 2.6 și figura 2.4). Receptorii alterați rămân activi o perioadă de timp mai lungă și inițiază astfel o cascadă de evenimente intracelulare a căror ultimă consecință o reprezintă modificarea activității genice.

În numeroase linii celulare transformate *in vitro*, protooncogenele ras, deși activate, nu prezintă mutații punctiforme. Transformarea malignă pare a se datora supraproducției de oncoproteine p21Ras, consecutivă amplificării sau deleției primului exon necodificant de lanț polipeptidic. De asemenea, în leucemiile limfoblastice acute cu celule T, cea mai frecventă alterare structurală este cea a genei tal1, rezultată prin translocarea genei pe cromozomul 1 (în apropierea locusului lanțurilor alfa și delta ale receptorului limfocitelor T), fie prin deleția unei regiuni de aproximativ 90 Kbaze din porțiunea 5′ a genei. Indiferent de tipul de alterare, efectul este același: expresia aberantă a genei tal1 în limfocitele T (în care, în mod normal, aceasta nu este activă) și blocarea implicită a procesului de diferențiere.

2.2.6. ONCOPROTEINELE ACȚIONEAZĂ PRINTR-UN NUMĂR LIMITAT DE MECANISME ASUPRA UNOR SUBSTRATURI EXTREM DE DIFERITE

Mecanismele biochimice prin care se realizează transformarea malignă sunt în număr de trei: fosforilarea proteinelor, transmiterea semnalelor prin GTP-aze, și controlul transcrierii mesajului genetic.

2.2.6.1. Fosforilarea proteinelor

Numeroase oncoproteine funcționează ca proteinkinaze (fosforilează diferite substraturi); procesul invers — defosforilarea — este catalizat de proteinfosfataze. Aceste două tipuri de enzime pot fi considerate ca

„yin" și „yang" în transducția intracelulară a semnalelor: kinazele sunt modulatori activi („yang"), în timp ce fosfatazele sunt contramodulatori pasivi („yin") ai stării fosforilate a proteinelor intracelulare. Această dichotomie pare, așadar, a fi asemănătoare cu principiile „yin" și „yang" din medicina tradițională chinezească, în care „yin" — reprezentând tot ce este „pasiv" sau „rece" — se află în echilibru cu „yang", care semnifică tot ceea ce este „activ" sau „fierbinte".

Activarea protooncogenelor disturbă această homeostazie, producând semnale care se deplasează rapid dintr-o regiune celulară în alta. În oncogeneză armonia dintre cele două principii este perturbată deoarece numeroase oncogene codifică proteinkinaze implicate în stimularea proliferării: fosforilarea devine prevalentă, în detrimentul defosforilării, posibil mai importantă în inițierea multiplicării celulare. Substraturile supuse fosforilării sunt variate: alte proteinkinaze (de exemplu proteinkinaza C și fosfatidilinozitolkinaza 1 sau kinazele implicate în controlul diviziunii celulare), moleculele proprii (autofosforilare) sau substraturi cu alte activități (de exemplu, molecule de adezivitate intercelulară, fosfolipaza C). Cele mai cunoscute oncogene care acționează prin fosforilare sunt prezentate în tabelele 2.4, *a*, 2.4, *b* și 2.6.

2.2.6.2. Transmiterea semnalelor prin GTP-aze

GTP-azele sunt proteine heterotrimerice care leagă și hidrolizează nucleotidele guaninice. Acționând într-un mod analog comutatorilor din circuitele de procesare a informațiilor, aceste proteine conectează receptorii cu activitate kinazică de pe suprafața celulelor (receptorii factorilor de creștere) cu diferitele tipuri de efectori (adenilatciclaza, fosfolipaza etc.). Importanța proteinelor Ras rezidă în rolul lor de dispeceri de semnale: la nivelul lor converg numeroase tipuri de informații din amonte, iar de la nivelul lor diverg semnale către substraturi foarte diferite. Proteinele acestei familii pot fi considerate adevărate „turnuri de control" localizate pe fața internă a membranei plasmatice (vezi figura 2.5 și paragraful 2.2.8.1, figura 2.15, *a*). De menționat că, datorită importanței lor cruciale în transmiterea corectă a informațiilor, circuitele realizate de proteinele Ras sunt lipsite de redundanță; alterarea genelor Ras nu poate fi compensată prin funcționarea altor gene, fapt care explică de ce mutațiile lor sunt întâlnite într-un spectru larg de neoplasme și la un număr mare de bolnavi.

2.2.6.3. Controlul transcrierii ADN

Sunt cunoscute numeroase protooncogene care codifică proteine nucleare implicate în controlul sintezei ARN mesager (vezi tabelul 2.7). Modificările calitative sau cantitative ale unor factori de transcriere, survenite în urma activării protooncogenelor care îi codifică, determină alterări atât ale expresiei genelor pe care le controlează, cât și ale expresiei propriilor gene (prin efect dominant negativ asupra corespondentelor normale). De aceea, genele care codifică factori de transcriere sunt de-

numite „master genes", iar cele reglate de aceşti factori — „responder genes".

Consecinţele posibile ale alterării structurale a factorilor de transcriere sunt:

a) recunoaşterea de către domeniul de legare la ADN a unor secvenţe nucleotidice ilegitime şi exprimarea subsecventă a unor gene efectoare, altele decât cele ce urmau să fie transcrise; aceste gene se vor exprima normal (în sensul că proteinele sintetizate nu vor prezenta anomalii structurale sau funcţionale), dar manifestarea lor va fi inadecvată în raport cu etapa de dezvoltare ontogenetică;

b) funcţia activatoare a factorului de transcriere poate fi convertită în una represoare, sau invers; astfel, deşi acţionează asupra genei efectoare conform specificităţii sale, factorul de transcriere alterat va produce efecte contrarii celor programate.

Variaţiile cantitative ale factorilor de transcriere conduc la supraexprimarea sau, invers, la diminuarea până la dispariţie a activităţii transcripţionale a genelor efectoare.

S-a arătat că, în neoplazii, coexistenţa modificărilor calitative şi cantitative ale factorilor de transcriere reprezintă un fenomen uzual, dar că prezenţa unor modificări adiţionale este indispensabilă realizării integrale a fenotipului malign.

În contrast cu spectrul limitat al mecanismelor de activare şi de acţiune a protooncogenelor, substraturile asupra cărora acţionează oncoproteinele sunt multiple şi polimorfe. Genele a căror activitate este modificată în cursul transformării maligne sintetizează proteine din familiile antigenelor de suprafaţă, citokinelor, proteazelor, componentelor căilor metabolice sau ale celor de semnalizare, factorilor de stres (tabelul 2.11). Nici una dintre aceste gene nu este implicată în inducerea

Tabelul 2.11

Exemple de gene aflate sub controlul oncogenelor

Clasa de gene	Gene care codifică pentru:
1. Antigene de suprafaţă	Componentele MHC clasa I
2. Citokine	Factori asemănători PDGF, factori asemănători insulinei, factor de creştere transformant alfa şi beta, IL-1, IL-2, IL-8
3. Proteaze	Colagenază, catepsină, activator al plasminogenului
4. Componente ale căilor metabolice sau de semnalizare	rho B, calmodulină, enzime implicate în transportul hexozelor şi în sinteza lipidelor eicosanoidice
5. Factori de stres	hsp 70, GRP 78, GRP 95
6. Alte gene	MDR 1, T61, SAA, beta-globină

MHC=complex major de histocompatibilitate; IL=interleukină; hsp 70=heat shock protein 70 kDaltoni; GRP=proteina reglată de glucoză; MDR=rezistenţă multiplă la citostatice; SAA=amiloid A seric.

malignizării, dar disturbarea activității lor contribuie la realizarea pletorei de modificări (structurale, biochimice, funcționale) care caracterizează celula canceroasă.

2.2.7. ACTIVITATEA UNEI SINGURE ONCOGENE NU ESTE SUFICIENTĂ PENTRU TRANSFORMAREA MALIGNĂ

Investigațiile utilizând tehnici moderne ale geneticii moleculare au demonstrat că, în marea lor majoritate, tumorile maligne conțin alterări ale ADN care interesează situsuri oncogenice multiple. Tumorile raportate a fi purtătoare ale unor alterări unice constituie excepții a căror natură este — cel mai probabil — artefactuală.

Coexistența în genomul celulei canceroase a mai multor oncogene reprezintă condiția obligatorie a progresiunii tumorale. Patru categorii de dovezi experimentale pledează în acest sens:

a) Studiile efectuate pe celule cultivate *in vitro* au arătat că, acționând separat, nici oncogena ras, și nici oncogena myc nu sunt capabile să inducă transformarea malignă; când acționează împreună, cele două gene determină malignizarea, una producând imortalizare (oncoproteina Myc), cealaltă imprimând restul trăsăturilor caracteristice fenotipului malign (Ras).

b) Când se încrucișează șoareci transgenici aparținând unor linii diferite în ce privește oncogena pe care o poartă, incidența tumorilor la descendenți este mai mare decât cea înregistrată la descendenții provenind din încrucișarea animalelor aceleași linii.

c) Unii viruși transformanți, ADN sau ARN, conțin în genomul lor două oncogene, ambele indispensabile realizării competenței transformante; de exemplu, antigenul mare și antigenul mijlociu ale virusului *polioma* trebuie să fie prezente împreună pentru ca infectarea fibroblaștilor de șoarece să se soldeze cu transformarea malignă; similar, activitatea transformantă a virusului eritroblastozei aviare este condiționată de prezența în același genom a oncogenelor v-erbA și v-erbB.

d) Infectarea concomitentă cu doi retroviruși, purtători ai unor oncogene diferite, determină un fenotip cu grad mai înalt de malignitate decât fenotipurile induse de fiecare din cei doi retroviruși în parte.

Aceste observații s-au constituit în premise ale conceptului de cooperare a oncogenelor care postulează că malignizarea reclamă intervenția a cel puțin două oncogene din familii diferite structural și funcțional, și care își potențează reciproc efectul tumorigenic.

Prin analiza efectelor tumorigene ale unor combinații specifice de oncogene s-a stabilit că oncoproteinele care acționează în nucleu cooperează cel mai eficient cu oncoproteinele a căror activitate se desfășoară în citoplasmă. Categoria „nucleară" include genele c-myc, N-myc, L-myc, fos, jun, E1A (adenovirus), tax (HTLV), genele antigenului mare T (*virus polioma*, SV 40), iar categoria „citoplasmatică" — gene ca H-ras, K-ras, N-ras, src, erbB și genele antigenului T mijlociu. De regulă, activitatea oncoproteinelor nucleare nu este suficientă pentru modificarea morfologiei celulare sau a necesarului de factori de creștere extrinseci, dar poate determina imortalizarea celulelor. Invers, oncoproteinele citoplasmatice pot să determine reducerea cerințelor pentru factorii de creș-

tere, modifică morfologia celulară, dotează celulele cu independența de ancorare, dar nu realizează imortalizarea. S-au descris și cazuri particulare de cooperare între două oncogene, ambele „nucleare" sau „citoplasmatice".

Existența fenomenului de cooperare oncogenică este de natură să sugereze că, din punct de vedere funcțional, celulele sunt astfel organizate încât globalizarea răspunsurilor la influențele transformante ale unei singure oncogene este, practic, exclusă.

Se poate, așadar, deduce că protooncogena corespunzătoare este implicată în transducerea doar a unei anumite cantități — strict limitată — din informația necesară realizării controlului asupra desfășurării programelor de supraviețuire celulară; controlul se exercită, de altfel, prin intermediul unor circuite de semnalizare multiple, ale căror relee sunt proteinele codificate de protooncogene. Datorită redundanței acestor circuite, defectarea unui singur releu nu atrage după sine abolirea funcției pe care o deservește; mai multe defecțiuni, survenite pe circuite separate, pot însă compromite ireversibil activitatea mecanismelor de control, cu dezorganizarea consecutivă a celor trei programe celulare fundamentale: de creștere și proliferare, de diferențiere, și de moarte programată, ceea ce, în unele instanțe, se soldează cu apariția fenotipului malign.

Dezorganizarea celor trei programe apare deci a fi condiționată de acumularea unui număr „critic" de evenimente (diferit în funcție de tipul celular), indiferent de ordinea în care se succed acestea. Fiecare eveniment (a cărui natură este — esențialmente — mutațională) se corelează cu un stadiu al dezvoltării tumorilor, a căror evoluție presupune parcurgerea a două etape principale.

În prima etapă, un factor carcinogen din mediu (radiații ionizante, substanțe chimice, viruși) sau, pur și simplu, întâmplarea (mutația spontană) determină apariția unei modificări genetice „critice" (ireversibilă). Această modificare interesează o protooncogenă (sau un alt tip de genă implicată în patogenia neoplaziei și conduce la dezorganizarea programului de creștere și proliferare. Celula purtătoare se va multiplica mai activ, generând o clonă de dimensiuni ample, ceea ce va crește probabilitatea producerii unor mutații adiționale. Cu toate acestea, probabilitatea apariției de noi mutații va rămâne destul de redusă ca urmare a intervenției numeroaselor mecanisme paralele (redundante) de reparare a leziunilor ADN. S-a calculat că numărul de celule din organismul uman care prezintă mutații ale genelor ras ca primă alterare genetică este de 10^5—10^6; acest număr este cu mult mai mare decât cel al leziunilor precanceroase decelabile la orice vârstă. Mutațiile ras sunt, în general, evenimente genetice precoce, fiind detectate și în tumori benigne (adenoame colonice, tiroidiene etc.) sau în stări preneoplazice (sindroame mielodisplazice etc.).

O cale alternativă de realizare a expansiunii clonale o constituie creșterea duratei de viață a celulelor mutante, în condițiile în care rata proliferării se păstrează în limite normale.

Oricum, generarea unor clone supradimensionate reprezintă etapa inițială, comună dezvoltării tumorilor benigne și maligne. Rămân benigne tumorile ale căror celule nu fixează noi leziuni genetice care, prin

însumare și cooperare, ar putea să determine tranziția la fenotipul malign.

A doua etapă este caracteristică evoluției tumorilor maligne și comportă acumularea de mutații în situsuri oncogenice care complementează acțiunea mutațiilor inițiale. Se produce astfel dezorganizarea celorlalte programe (de diferențiere și/sau de moarte celulară programată), pentru ca, în final, celulele să-și dobândească invazivitate și capacitate de metastazare (figura 2.13).

Fenomenul de cooperare oncogenică apare, așadar, a fi determinant pentru geneza cancerului, în lipsa cooperării proliferările neoplazice păstrându-și caracterul benign.

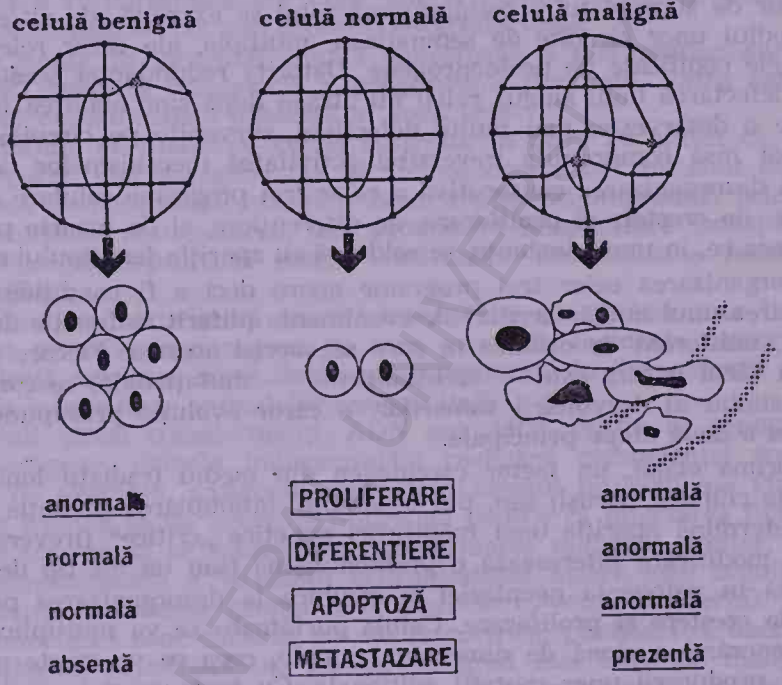


Fig. 2.13. Cooperarea oncogenelor este indispensabilă creșterii maligne.
Celulele (cercul exterior) și nucleii (elipsa interioară) sunt reprezentate bidimensional; de aceea, cele trei căi de semnalizare sunt figurate fiecare prin câte o linie orizontală și una verticală, și corespund programelor de creștere și proliferare, diferențiere și apoptoză. În figură, numărul critic de leziuni genice necesare malignizării este cel minim, și anume 2. În celula normală căile de semnalizare sunt interconectate într-o rețea funcțională continuă, în ochiurile căreia se află produșii proteici ai protooncogenelor. Fiecare alterare genică (reprezentată printr-un dreptunghi) are repercusiuni și asupra nodurilor adiacente, dar prezența altor interconexiuni redundante permite minimizarea dereglărilor funcționale. Apariția numărului critic de leziuni conduce la dezorganizarea rețelei și la implicita perturbare a desfășurării celor trei programe. Dacă leziunile interesează gene care își pot complementa efectele (cooperare oncogenică) devin posibile conversia la fenotipul malign și dobândirea potențialului invaziv. Un număr de alterări inferior celui critic poate fi evidențiat (la nivel genic și, uneori cromozomial) și în celulele tumorilor benigne.

2.2.8. CELULELE MALIGNE POSEDĂ „CĂI DE TRANSFORMARE" ALCĂTUITE DIN ONCOPROTEINE CONECTATE FUNCȚIONAL

În celulele maligne au fost identificate rețele de semnalizare intracelulară alcătuite din oncoproteine; prin aceste rețele, membrana plasmatică este conectată cu nucleul.

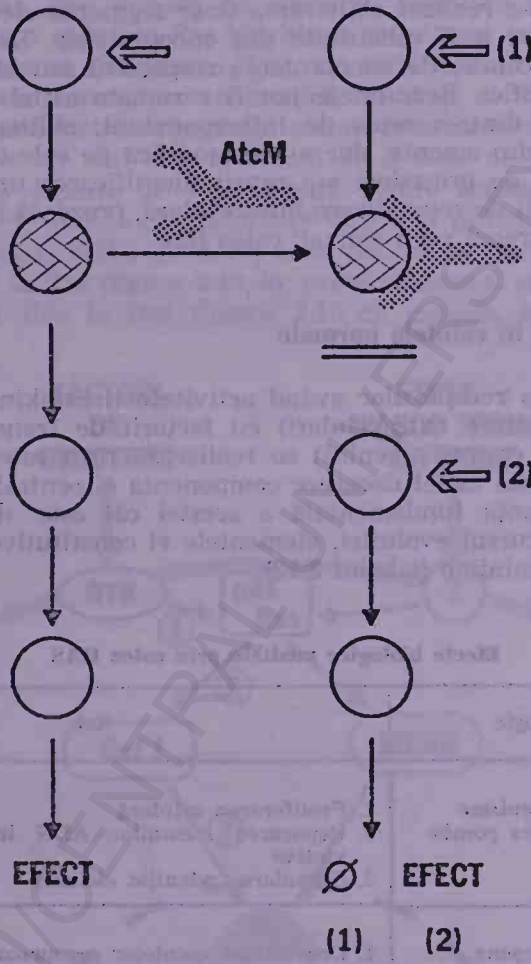


Fig. 2.14. Stabilirea rolului unei oncoproteine în cadrul unei rețele de proteine interconectate. (○) proteină; (◉) oncoproteină investigată; (⇐) stimul. Prin utilizarea unui anticorp specific se blochează activitatea biologică a oncoproteinei, perturbându-se astfel circulația informației în sistem. În această situație, stimularea unei proteine din amonte (upstream) determină apariția unui semnal care nu poate fi transmis mai departe și care rămâne, așadar, fără efect (1); stimularea unui component al căii de semnalizare, situat în aval (downstream), este urmată de producerea efectului biologic (2).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dovezi indirecte ale existenței unor astfel de rețele au fost furnizate încă din deceniul trecut, când s-a arătat că: (a) în celulele normale, numeroase proteine codificate de protooncogene sunt incorporate în sisteme importante de semnalizare intracelulară; (b) deși numărul oncogenelor este de ordinul zecilor iar structura și funcțiile lor sunt foarte variate, fenotipurile maligne apar ca fiind foarte similare; (c) malignizarea este aproape întotdeauna condiționată de cooperarea mai multor oncogene.

Dovezile peremptorii sunt de dată recentă și au fost aduse de experimentele în care s-a realizat obliterarea unor segmente ale căilor de semnalizare, presupuse a fi constituite din oncoproteine. Experimentele au vizat deprivarea celulei de oncoproteina respectivă sau blocarea acesteia cu anticorpi specifici. Rezultatele pot fi rezumate astfel: dacă oncoproteina face parte dintr-o rețea de interconexiuni, obliterarea blochează toate influențele din amonte, dar nu le modifică pe cele din aval (figura 2.14). Prin astfel de proceduri s-a reușit identificarea uneia dintre cele mai importante căi de semnalizare intracelulară, prezentă în toate tipurile de celule și în întregul regn animal: calea Ras.

2.2.8.1. Calea Ras în celulele normale

Interconectarea receptorilor având activitate tirozinkinazică (stimulați de factori de creștere extracelulari) cu factorii de transcriere nucleari (care controlează expresia genică) se realizează prin rețeaua de semnalizare Ras, denumită astfel deoarece componenta ei centrală este proteina p21 Ras. Importanța fundamentală a acestei căi este demonstrată de faptul că, pe parcursul evoluției, elementele ei constitutive nu au suferit decât modificări minime (tabelul 2.12).

Tabelul 2.12

Efecte biologice mediate prin calea RAS

Sistem biologic	Rol
Drojdii *Sacharomyces cerevisiae* *Schizosacharomyces pombe*	1. Proliferarea celulară 2. Repararea leziunilor ADN induse de ultraviolete 3. Stimularea adenilat ciclazei
Nematode *Caenorhabditis elegans*	1. Dezvoltarea celulelor precursoare vulvare
Insecte *Drosophila melanogaster*	1. Specificarea structurilor neuronale și vasculare 2. Slăbirea polarității dorsoventrale 3. Dezvoltarea celulelor fotoreceptoare R7 oculare
Mamifere *Homo sapiens* *Mus musculus*	1. Proliferarea și diferențierea celulară 2. Răspunsul la citokine 3. Activarea limfocitelor T

La om, rețeaua Ras este alcătuită din 4 componente care, dinspre exteriorul celulei către interior, sunt următoarele: (1) receptorul cu activitate tirozinkinazică (RTK) (de exemplu, receptorul factorului de creștere epidermal — EGFR —, sau al factorului de creștere derivat din plachete — PDGFR); 2) proteina p21Ras; (3) serintreoninkinaza Raf1; (4) factorii de transcriere (de exemplu, Myc, Fos, Jun) (figura 2.15, *a*). Proteina p21Ras este situată în aval de RTK, deoarece stimularea mitogenică a acestuia este urmată de creșterea cantității de Ras-GTP, iar mutațiile dominant negative Ras blochează activitatea mitogenică a RTK. În aval de p21Ras se află kinaza Raf1, ale cărei mutații oncogenice (activatoare) îi măresc activitatea enzimatică, în timp ce inhibarea funcției Raf1 blochează activitatea mitogenică a Ras. Interconectarea celor 4 componente esențiale ale căii este efectuată de o serie de proteine al căror număr este încă departe de a fi stabilit. Dintre acestea, cele mai bine caracterizate sunt: moleculele „adaptor" Grb 2 și proteinele cu activitate GRF—hSOS, SOS1, SOS2 și VAV, care realizează transmiterea semnalelor de la RTK la Ras (figura 2.15, *b*); proteinkinaza C și proteinele GAP, care conectează Ras la Raf (figura 2.15, *c*); cascada kinazelor activate

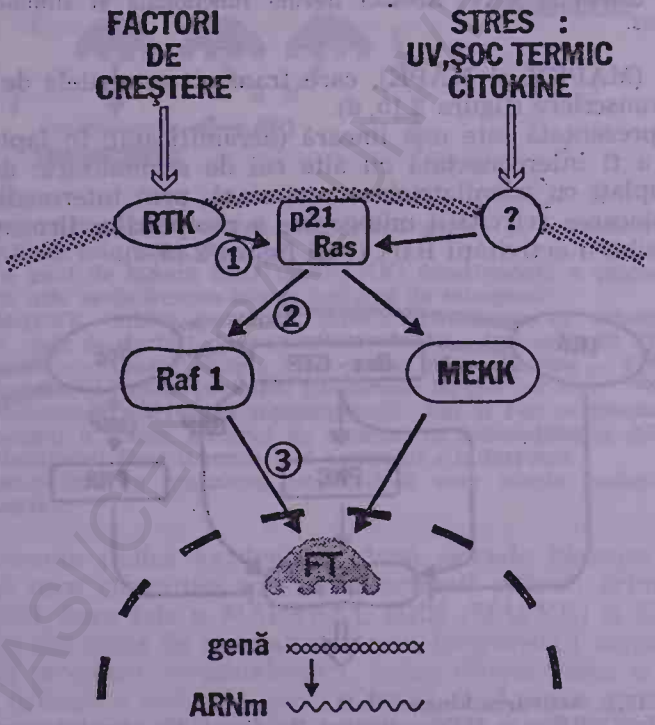


Fig. 2.15, a. Calea de semnalizare Ras.
Proteina codificată de protooncogena ras — p21Ras — constituie componentul central al rețelei care asigură transmiterea semnalelor de la receptorii tirozin-kinazici (RTK) prin intermediul serin/treonin-kinazelor citoplasmatice (Raf1) la factorii de transcriere din nucleu (FT).

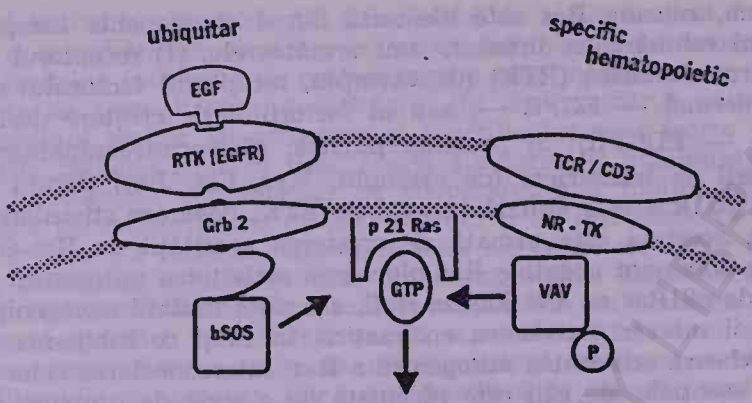


Fig. 2.15.b. Activarea proteinei p21Ras.
În orice tip de celulă, p21Ras devine activă prin legarea GTP sub acțiunea unei proteine GRF activatoare specifice — hSOS. Aceasta primește semnale de la RTK, activat ca urmare a complexării cu ligandul specific, prin intermediul unei molecule „adaptor" — Grb2 — care conține domenii de interacțiune SH2 și SH3. În limfocitele T receptorul celulelor T (TCR) activează o tirozin-kinază nonreceptor (NR-TK) care fosforilează o proteină GRF denumită VAV. Aceasta devine funcțională și stimulează p21Ras.

de mitogeni (MAPKK și MAPK), care transmit semnalele de la Raf1 la factorii de transcriere (figura 2.15, *d*).

Schema prezentată este una lineară (neramificată); în fapt, calea Ras s-a dovedit a fi interconectată cu alte căi de semnalizare: de exemplu, receptorii cuplați cu adenilatciclaza realizează, prin intermediul protein-kinazei A, blocarea activității mitogenice a receptorilor tirozinkinazici ca urmare a inhibării activității Raf1 (vezi figura 2.15, *c*).

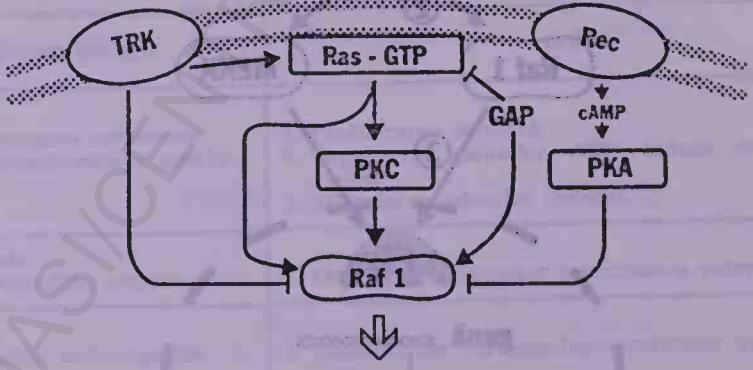


Fig. 2.15, c. Activarea kinazei Raf1.
Proteina p21Ras — GTP activează fie direct, fie prin intermediul protein-kinazei C (PKC), serin/treonin-kinaza Raf1. Același efect îl are și acțiunea RTK sau a proteinelor GAP (inhibitoare ale Ras-GTP). La nivelul kinazei Raf1 se realizează o importantă conexiune cu o altă rețea de semnalizare (calea c-AMP): protein-kinaza A (PKA) blochează activitatea mitogenică a căii Ras prin inhibarea funcționării Raf1. (⇒) — stimulare; (⊣) — inhibare.

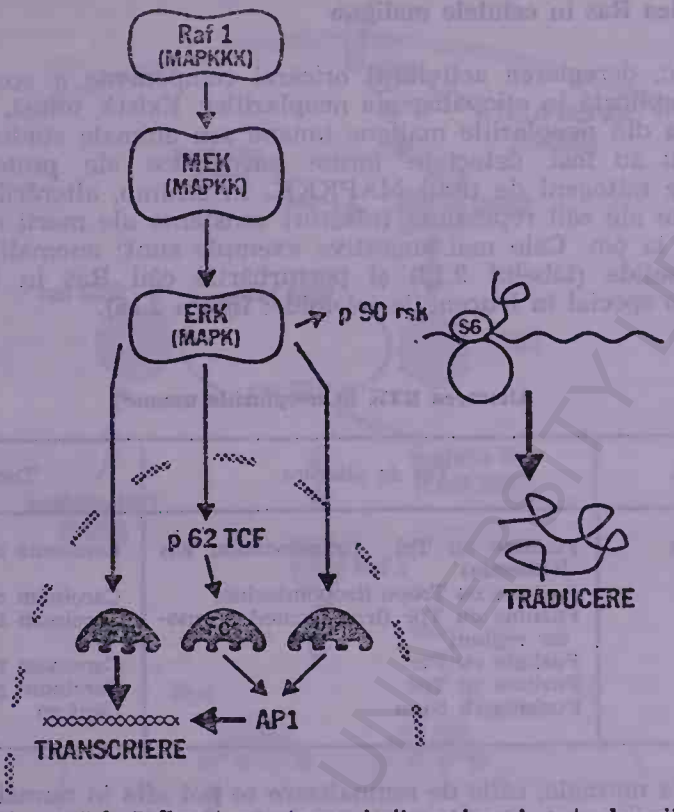


Fig. 2.15,d. Influenţarea transcrierii genice şi a traducerii ARNm prin calea Ras.
In aval de kinaza Raf1 (MAPKKK) funcţionează o cascadă de alte serin/treonin-kinaze activate de mitogenii: MAPKK (MEK) şi MAPK (ERK). MAPK are ca substrat o serie de factori de transcriere — Myc, Jun sau p62 TCF (care controlează sinteza altui factor de transcriere — FcS), precum şi kinaza proteinei ribozomale S6-p90 rsk care stimulează activitatea translaţională. Jun şi Fos se asociază pentru a forma factorul de transcriere heterodimeric API. Rezultatul final îl reprezintă controlul a numeroase gene-ţintă cu realizarea implicită a unor efecte biologice variate.

Date recente indică existenţa a două cascade kinazice activate de mitogeni, şi care constituie substratul acţiunii p21raf; prima este alcătuită din Raf1 (care este o MAPKKK), MEK (MAPKK) şi ERK (MAPK) şi face parte din calea de semnalizare prin intermediul căreia factorii de creştere, via receptorii tirozinkinazici, induc diferenţierea şi proliferarea celulară ca urmare a inducţiei genei c-fos şi a celorlalte gene care conţin domeniul de răspuns la SRE.; a doua este formată din MEKK-1 (MAPKKK) substrat direct al acţiunii Ras, SEK1 (MAPKK) şi JKN (o MAPK activatoare a genei jun) şi conduce la apariţia factorului de transcriere AP-1. Această cascadă devine funcţională atunci când celula este supusă stresurilor extrinseci (ultraviolete, şoc termic sau citokine inhibitoare ale sintezei proteice); activarea ei, prin p21Ras blochează atât creşterea celulară cât şi răspunsurile celulare la stres.

2.2.8.2. Calea Ras în celulele maligne

Teoretic, dereglarea activității oricărei componente a acestor căi ar putea fi implicată în etiopatogenia neoplaziilor. Există, totuși, o excepție: în nici una din neoplaziile maligne umane sau animale studiate până în prezent nu au fost detectate forme oncogenice ale proteinkinazelor activate de mitogeni de tipul MAPKKK. În schimb, alterările celorlalte componente ale căii reprezintă trăsături constante ale marii majorități a cancerelor la om. Cele mai sugestive exemple sunt: anomaliile RTK în tumorile solide (tabelul 2.13) și perturbările căii Ras în hemopatiile maligne (în special în leucemiile mieloide; figura 2.16).

Tabelul 2.13

Alterarea RTK în neoplaziile umane

RTK	Tip de alterare	Tumora
PDGF beta	Fuziune cu Tel (translocation Ets leukemia)	Leucemie mieloidă
TRK	Fuziune cu Tropo (tropomiozine)	Carcinom colonic
	Fuziune cu Tpr (translocated promotor region)	Carcinom tiroidian
RET	Fuziune cu Ptc	Carcinom tiroidian
MET	Fuziune cu Tpr	Carcinom gastric
ALK	Fuziune cu Npm	Limfom

În celula normală, căile de semnalizare se pot afla în numai două stări funcționale: integral „închise" și integral „deschise". Comutarea de la o stare la alta se realizează la nivelul receptorilor plasmalemali, în funcție de prezența sau absența stimulilor specifici, și este posibilă numai în anumite etape ale dezvoltării ontogenetice a celulei.

În celulele neoplazice, ca urmare a activității oncogenelor, fiecare din cele trei relee principale ale căilor de semnalizare își poate dobândi funcția de comutator, activând segmentele subiacente ale circuitului, chiar în lipsa stimulilor extracelulari.

2.2.9. ÎN GENOMUL CELULELOR NORMALE SE AFLĂ GENE CARE INHIBĂ APARIȚIA TUMORILOR

Paragrafele precedente au prezentat dovezile existenței în genomul celular a acelei categorii de gene — colectiv denumite oncogene — a căror activare aberantă se face răspunzătoare de transformarea malignă a celulelor purtătoare. S-a arătat că definitoriu pentru oncogene este caracterul dominant al exprimării lor fenotipice.

În afară de oncogene, în genom există și o altă clasă de secvențe ADN cu rol crucial în tumorigeneză. În opoziție cu oncogenele, acestea funcționează împiedicând dezvoltarea tumorilor: inițierea creșterii tumorale se produce numai atunci când ambele copii ale unei astfel de secvențe sunt inactivate sau pierdute. Aceste secvențe, a căror exprimare fenotipică

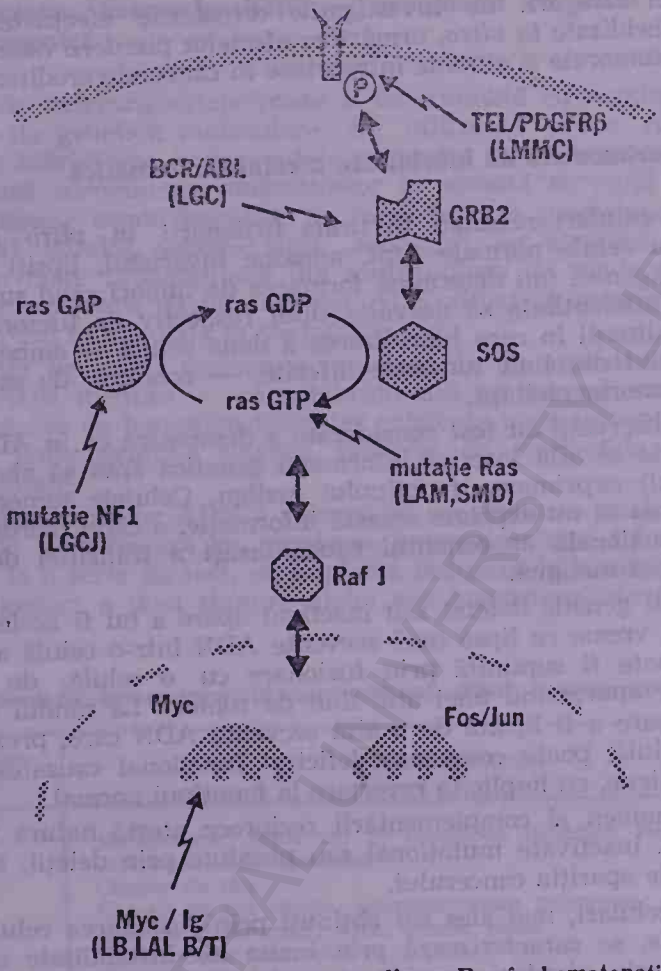


Fig. 2.16. Alterarea căii de semnalizare Ras în hematopatiile maligne umane.
LGC=leucemie mieloidă cronică; LMMC=leucemie mielomonocitară cronică; LGCJ=leucemie mieloidă cronică juvenilă; LAM=leucemii mieloblastice acute; SMD=sindroame mielodisplazice; LB=limfom Burkitt; LAL B/T=leucemie acută limfocitară cu celule B sau T.

apare, aşadar, a fi recesivă, sunt cunoscute sub diferite denumiri, cea mai răspândită fiind aceea de antioncogene.

Termenul de antioncogenă este însă impropriu şi generator de confuzii: aceste secvenţe nu sunt antagonistele oncogenelor, ci îndeplinesc funcţii esenţiale în controlul negativ al creşterii şi proliferării normale a celulelor. Dintre celelalte denumiri — oncogene recesive, gene oncosupresoare, emerogene, platogene, gene de supresie a creşterii tumorale —, ultima pare să definească cel mai adecvat modul în care acţionează aceste secvenţe, şi, ca atare, va fi cea utilizată în prezentul text (sub forma prescurtată — GSCT).

Faptul că în transformarea malignă sunt implicate gene care intervin în reglarea negativă a proliferării celulare a fost sugerat de datele furni-

zate de trei categorii de investigaţii: cercetările efectuate pe celule somatice hibridizate *in vitro*, urmărirea efectelor pierderii heterozigozităţii în celulele tumorale şi studiile întreprinse în cancerele ereditare.

2.2.9.1. Experimentele de hibridizare a celulelor somatice

Hibrizii celulari rezultaţi în urma fuzionării *in vitro* a celulelor tumorale cu celule normale sunt, aproape invariabil, lipsiţi de competenţă tumorigenică (nu determină formarea de tumori când sunt injectaţi la animale susceptibile să dezvolte tipul respectiv de tumoră). Au fost descrise şi situaţii în care hibridizarea a două celule — ambele maligne, dar provenind din linii tumorale diferite, — conduce, de asemenea, la pierderea tumorigenicităţii.

Aceste observaţii au fost considerate a demonstra că în ADN al celulelor normale se află înscrisă informaţia genetică aptă să aboleasca (cel puţin parţial) exprimarea fenotipului malign. Celulele tumorale par să nu posede sau să nu exprime această informaţie, a cărei pierdere sau suprimare funcţională ar constitui cauza însăşi a tranziţiei de la starea normală la cea malignă.

Materialul genetic deletat sau inactivat apare a nu fi acelaşi în toate tumorile, de vreme ce lipsa unei secvenţe ADN într-o celulă a unei linii tumorale poate fi suplinită prin fuzionare cu o celulă, de asemenea malignă, dar aparţinând unei alte linii de tumori. La rândul ei, aceasta din urmă apare a fi lipsită de o altă secvenţă ADN care, prezentă fiind în prima celulă, poate compensa deficitul funcţional cauzator al transformării maligne, cu implicita revertare la fenotipul normal.

Acest fenomen al complementării reciproce atestă natura recesivă a genelor care, inactivate mutaţional sau pierdute prin deleţii, se fac răspunzătoare de apariţia cancerului.

Hibrizii celulari, mai ales cei obţinuţi prin fuzionarea celulelor unor specii diferite, se caracterizează prin înalta lor instabilitate cariotipică, manifestată prin pierderea rapidă şi preferenţială a cromozomilor proveniţi de la una dintre celulele parentale. Când, în urma mitozei, sunt pierduţi cromozomii celulei normale, segreganţii îşi redobândesc competenţa tumorigenică. Prin corelarea revertării la fenotipul malign cu pierderea anumitor cromozomi s-a putut stabili care dintre cromozomii complementului normal sunt purtători ai genelor cu rol în normalizarea programului de creştere a celulelor maligne. Astfel, analiza comportării hibrizilor realizaţi între celule HeLa şi fibroblaşti diploizi umani a relevat implicarea cromozomului 11 în expresia tumorigenicităţii. Prezenţa ambelor copii ale cromozomului 11 normal în celulele hibride a abrogat complet competenţa tumorigenică, în timp ce pierderea uneia dintre copii s-a asociat constant cu redobândirea acestei competenţe.

Rezultatele experimentelor de hibridizare a celulelor somatice reprezintă dovezi circumstanţiale ale faptului că progresiunea către starea de malignitate este obligatoriu însoţită de pierderi ale unora dintre secvenţele ADN implicate în reglarea negativă a creşterii şi proliferării. Dovezile formale au fost aduse de cercetările care au definit efectele pierderii heterozigozităţii în celulele tumorale.

2.2.9.2. Pierderea heterozigozității — eveniment cu certă semnificație oncogenică

Starea de heterozigozitate poate fi determinată cu maximă acuratețe prin tehnicile geneticii moleculare. Se utilizează probe ADN (sonde) capabile să hibridizeze cu secvențele genomice care urmează să fie identificate; dacă succesiunea nucleotidelor în această secvență este cunoscută, se folosesc sonde specifice; în cazul în care succesiunea nu a fost în prealabil definită, sondele sunt „anonime", iar alegerea lor — aleatorie; cu o mare probabilitate, din multitudinea de sonde aplicate, una va fi complementară cu un segment ADN situat în interiorul genei de identificat, sau în imediata sa vecinătate.

Existența pe ambii cromozomi omologi, la un anumit locus, a unor secvențe ADN identice — care hibridizează cu aceeași sondă ADN — definește starea de homozigozitate, iar existența unor secvențe care diferă între ele, chiar printr-o singură pereche de nucleotide, pe cea de heterozigozitate.

Utilizarea sondelor ADN a relevat că progresiunea majorității tumorilor solide se corelează cu pierderea heterozigozității („loss of heterozigosity") la o serie de loci, cu implicita reducere la hemizigozitate (prezența în genom a unei singure alele) sau homozigozitate (tabelul 2.14).

Tabelul 2.14

Pierderea heterozigozității constituționale (PHC) în tumorile umane

Localizare PHC	Tipul tumorilor
1p	Melanoame; MEN tip 2; carcinom tiroidian medular; neuroblastom; feocromocitom
1q	Cancer de sân
3p	Cancer de col uterin; adenocarcinom pulmonar; cancer pulmonar cu celule mici; VHL; cancer renal
5q	FAP; cancer colorectal
9q	Cancer vezical
10q	Astrocitom; MEN tip 2
11q	Tumora Wilms; rabdomiosarcom; cancer de sân; hepatoblastom; cancer vezical cu celule tranziționale; cancer pulmonar
13q	Retinoblastom; osteosarcom; cancer pulmonar cu celule mici; cancer de sân; cancer gastric; cancer colorectal; cancer vezical
17p	Cancer pulmonar cu celule mici; cancer colorectal; cancer de sân; osteosarcom; astrocitom; cancer pulmonar cu celule scuamoase
17q	NF tip 1
18q	Cancer colorectal
22q	NF tip 2; meningiom; neurinom de acustic; feocromocitom

Se observă că într-un anumit tip de tumoră pot exista mai multe PHC, ceea ce demonstrează implicarea în etiopatogenia tumorii a mai multe gene supresoare; se observă, de asemenea, că predispoziția la un același cancer ereditar poate fi determinată de gene diferite.

Un exemplu sugestiv de pierdere a heterozigozității este cel al retinoblastomului. Gena care determină predispoziția ereditară la dezvoltarea tumorii — denumită gena Rb1 — a fost localizată în regiunea q14 a

cromozomului 13. Prin aplicarea unui set de sonde ADN specifice pentru această regiune a genomului, s-a constatat că celulele normale ale copiilor cu retinoblastom ereditar sunt heterozigote pentru markeri ADN din segmentul 13q14; în celulele tumorale starea de heterozigozitate este pierdută ca urmare fie a deleției alelei normale, fie a eliminării întregului cromozom 13 normal. Duplicarea consecutivă a copiei conținând gena defectivă determină „reducerea la homozigozitate". Acesta nu este decât unul dintre multiplele mecanisme implicate în apariția retinoblastomului ereditar (vezi paragraful 2.2.17.1); toate, însă, acționează determinând pierderea heterozigozității constituționale — condiția esențială a inițierii creșterii tumorale. Prin inferență, genei Rb1 i se poate, așadar, atribui funcție de GSCT și caracter recesiv.

Extrapolarea la alte tumori a datelor obținute prin studiul retinoblastomului a generat ipoteza că regiunile genomice cele mai frecvent afectate de pierderea heterozigozității ar reprezenta sediul unor GSCT ale căror deleții sau mutații s-ar face răspunzătoare de progresiunea bolii canceroase. Ipoteza a fost confirmată, printre altele, și de observațiile efectuate pe tumori colonice avansate, în care pierderea heterozigozității pentru un marker ADN situat într-o regiune polimorfică a brațului lung al cromozomului 18 este întâlnită în peste 70% din cazuri; clonarea regiunii respective a făcut posibilă identificarea unei GSCT, denumită DCC („deleted in colon carcinoma"; vezi paragraful 2.2.10). Printr-o procedură similară a fost identificată și gena cea mai frecvent alterată în tumorile umane: p53.

De menționat că pierderea heterozigozității nu este un indicator exclusiv al alterărilor survenite la nivelul GSCT; în stadiile avansate ale dezvoltării tumorilor, ca urmare a instabilității genomice exagerate, se produc zeci și sute de mutații, multe situate în regiuni necodante ale ADN, și care, modificând structura unor markeri polimorfici, determină pierderea heterozigozității. În acest caz, fenomenul nu este o cauză a malignizării, ci consecința directă a acesteia.

2.2.9.3. **Studiul cancerelor ereditare**

Potrivit modelului Knudson (vezi 2.2.17.1), evenimentul primar în geneza cancerelor ereditare are loc în celulele germinale ale unuia dintre părinți. Natura evenimentului poate să difere (mutație, deleție, amprentare), dar gena afectată este, în mod obligatoriu, una recesivă, deoarece alterarea ei nu se însoțește de modificări fenotipice celulare care ar putea — prin perturbarea proceselor de creștere, proliferare și diferențiere — să conducă la letalitate embriofetală sau la apariția de dismorfogenezii.

Prezența în genom a alelei defective nu este, însă, complet lipsită de consecințe: organismul purtător va fi susceptibil la dezvoltarea tumorilor. Predispoziția nu se transformă, totuși, în boală decât atunci când se produce un al doilea eveniment mutațional, de data aceasta în celulele somatice, și în urma căruia alela normală devine, la rândul ei, nefuncțională (pierderea heterozigozității).

Asumând caracterul recesiv al genelor susceptibilității și funcția lor supresoare, modelul Knudson rezolvă aparentul paradox rezultat din faptul că, deși predispoziția la cancer se transmite dominant (50% dintre

descendenţi moştenesc alela susceptibilităţii), gena răspunzătoare de apariţia cancerului se manifestă recesiv.

Teoretic, genele implicate în etiopatogenia cancerelor ereditare nu pot fi decât recesive. Acţiunea unor gene dominante — aşa cum sunt oncogenele — ar fi incompatibilă cu dezvoltarea normală a embrionului. „Pierderea de funcţie" („loss of function") antrenată de o mutaţie recesivă este însă „mascată" de alela normală care, prin activitatea ei, asigură sinteza unei cantităţi suficiente de proteină „supresoare". Inactivarea unei singure alele nu impietează, deci, asupra dezvoltării embrionare. „Reducerea la homozigozitate", consecutivă producerii celui de al doilea eveniment, echivalează cu iniţierea creşterii neoplazice deoarece, lipsită fiind de proteina supresoare, celula homozigotă pentru mutaţia inactivatoare scapă de sub controlul mecanismelor care reglează proliferarea şi diferenţierea, dobândindu-şi autonomie a creşterii.

Cu toate acestea, trebuie arătat că există cel puţin o situaţie în care susceptibilitatea la dezvoltarea unui cancer ereditar apare a fi determinată de o mutaţie dominantă: activarea mutaţională a protooncogenei ret în celulele liniei germinale predispune descendenţii la apariţia sindromului MEN 2.

Înainte de a se trece la prezentarea principalelor sindroame neoplazice ereditare al căror studiu a avut o contribuţie majoră la realizarea conceptului de GSCT, mai trebuie precizat că, din cele zece GSCT clonate până în prezent, doar două au fost detectate în alte cancere decât cele ereditare, şi că în etiopatogenia fiecărui tip de cancer ereditar este implicată cel puţin o GSCT (tabelele 2.15, 2.16).

2.2.9.4. Sindroame neoplazice cu transmitere ereditară

2.2.9.4.1. Retinoblastomul: vezi paragraful 2.2.17.

2.2.9.4.2. Tumora Wilms: este cea mai frecventă tumoră solidă intraabdominală întâlnită la copii (incidenţa — 1 : 10.000); derivă din celulele stem embrionare — nefroblaşti — din care se formează nefronul. Existenţa unei predispoziţii genetice a fost sugerată de două categorii de observaţii: în 5% din cazuri tumorile sunt bilaterale, multicentrice (forme ereditare); tumorile Wilms se asociază frecvent cu o serie de anomalii specifice care definesc sindroamele ereditare prezentate în tabelul 2.17 (vezi şi paragraful 2.2.17).

Studiile citogenetice şi moleculare au precizat localizarea cromozomială a două GSCT implicate în etiopatogenia acestor tumori: WT1, pe 11p13 (această genă a fost clonată) şi WT2, pe 11p15. În determinarea susceptibilităţii pare să intervină şi o a treia genă a cărei existenţă este relevată de studiile întreprinse pe familii mari, dar căreia nu i s-a stabilit încă localizarea genomică.

2.2.9.4.3. Polipoza adenomatoasă familială (FAP — „familial adenomatous polyposis"): reuneşte sindroamele ereditare cu transmitere dominant autozomală care predispun la dezvoltarea unuia dintre cele mai frecvente neoplasme ale adultului — cancerul rectocolonic; se caracte-

Tabelul 2.15

Implicarea genelor de supresie a creşterii tumorale în cancerele familiale şi sporadice

Antioncogenă	Mutaţie predispozantă (germinală)		Mutaţie somatică
	Sindrom	Neoplasme tipice	Exemple de neoplasme
p53	Li-Fraumeni	Carcinoame de sân şi adrenocorticale, sarcoame, leucemii, tumori cerebrale	Aproximativ 50% din totalul neoplasmelor
RB 1	Retinoblastom	Retinoblastom, osteosarcom	Retinoblastom, osteosarcom, carcinom mamar, prostatic, vezical şi pulmonar, leucemii acute
WT 1	Tumora Wilms	Tumora Wilms	Tumora Wilms, leucemii acute mieloblastice
APC	FAP	Carcinom de colon, stomac şi tiroidă	Carcinoame colonice, gastrice, pancreatice, scuoamoase orale şi pulmonare
VHL	Von Hippel-Lindau	Hemangioblastom şi carcinom renal	?
NF 1	Neurofibromatoza 1	Tumori neurale	Schwanoame
NF 2	Neurofibromatoza 2	Meningioame şi schwanoame SNC	Schwanoame şi meningioame
BRCA 1	Cancer de sân ereditar	Carcinom mamar	Carcinom mamar
DCC	?		Carcinom rectocolonic şi pancreatic
MCC	?		Carcinom rectocolonic

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 2.16

Principalele caracteristici ale genelor de supresie a creşterii tumorale implicate în tumorigeneza umană

Anti-oncogenă	Locus cromozomial	Localizarea produsului proteic	Funcţiile produsului proteic	GM (kDa)
DCC	18q21	Membrana plasmatică	Adezivitate celulară	190
MCC	5q21	Membrana plasmatică	Inhibitor proteină G (?)	
VHL	3p25	Membrana plasmatică	Adezivitate celulară/transducţia semnalelor	34
APC	5q21	Citoplasmă	?	310
NF 1	17q11	Citoplasmă	Proteină GAP	327
NF 2	22q	Citoplasmă	Conectare membrană-citoschelet	66
WT 1	11p13	Nucleu	Factor de transcriere	45
RB 1	13q14	Nucleu	Factor de transcriere	110
BRCA 1	17q21	Nucleu	Factor de transcriere (?)	
p53	17p13	Nucleu	Factor de transeriere	53

rizează prin prezenţa a sute sau chiar mii de polipi cu structură adenomatoasă care pavează întreaga mucoasă colonică; polipii apar în a doua decadă a vieţii, iniţial în colonul stâng, şi se pot extinde şi în intestinul subţire şi stomac; dacă nu se practică rezecţia profilactică a colonului, cel puţin unul dintre polipi se va maligniza până la vârsta de 50 de ani.

FAP este produsă de mutaţii la nivelul genei APC — o GSCT localizată pe braţul lung al cromozomului 5, în regiunea q21. În aceeaşi regiune se află şi locusul unei alte gene implicată în cancerul rectocolonic, dar nu şi în apariţia FAP, denumită MCC, şi care codifică o proteină similară structural cu produsul genei APC (vezi 2.2.10.).

2.2.9.4.4. Sindromul von Hippel Lindau (VHL): este o boală rară, cu transmitere autozomal dominantă şi expresivitate variabilă. Purtătorii alterărilor la locusul VHL dezvoltă unul sau mai multe din următoarele tipuri de tumori: hemangioblastoame — în special retiniene şi cerebeloase —, chisturi hepatice, renale, pancreatice şi epididimare, hipernefroame, carcinoame renale şi, mai rar, feocromocitoame. Gena VHL a fost clonată recent, şi este situată pe cromozomul 3, la nivelul benzii

3p25; un al doilea locus s-ar afla tot pe brațul scurt al cromozomului 3p(3p14—21).

2.2.9.4.5. Neurofibromatoza: se clasifică în două tipuri principale: NF1, sau neurofibromatoza Von Recklinghausen, și NF2 — neurofibromatoza centrală. NF1, cu o incidență de 1 : 3—4 000 și cu rată de mutație de 10^{-4}, se situează printre cele mai frecvente sindroame cu transmitere autozomal dominantă. Boala debutează în copilărie și se caracterizează prin: leziuni cutanate (macule hiperpigmentate, de culoarea cafelei cu lapte; neurofibroame); leziuni oculare (hamartoame iridiene pigmentate — noduli Lisch); leziuni tumorale ale sistemului nervos central (glioame de nervi optici, astrocitoame, neurofibroame). NF1 se asociază cu neoplasme extraneurale: leucemii, osteoame, rabdomiosarcoame, meningioame multiple, tumoră Wilms. Cei mai mulți dintre bolnavi cu NF1 mor de cancer. Gena NF1 a fost localizată la 17q11.

NF2 este o boală mult mai rară, caracterizată prin dezvoltarea, la vârsta adultă, de neuroame bilaterale ale nervului acustic, meningioame, neurofibroame paraspinale cervico-toracale și cataractă. Locusul NF2 se află în regiunea proximală a brațului lung al cromozomului 22 (22q12).

2.2.9.4.6. Sindroamele neoplaziilor endocrine multiple („multiple endocrine neoplasia syndromes — MEN") se clasifică, în funcție de localizarea proceselor neoplazice, în două tipuri: MEN I și MEN II.

MEN I se caracterizează prin proliferări adenomatoase cu potențial malign ale paratiroidelor, pancreasului endocrin și glandei pituitare. În celulele acestor tumori se detectează frecvent pierderea heterozigozității pentru markeri din regiunea proximală a brațului lung al cromozomului 11 (11q13).

MEN II asociază carcinomul medular tiroidian cu feocromocitomul și hiperplazia paratiroidelor (MEN IIa, sau sindromul Sipple). Tumorile tiroidiene derivă din celulele parafoliculare, secretoare de calcitonină (celule C). Aproximativ 25% din cancerele medulare tiroidiene sunt ereditare și se transmit dominant autozomal. Analiza comparativă a formelor ereditare și sporadice a demonstrat remarcabila adecvare a aspectelor patogenice la modelul Knudson. Hiperplazia celulelor C, prezentă exclusiv în cazurile ereditare, apare a fi indusă de un prim eveniment mutațional; tranziția la malignitate necesită un al doilea eveniment, în urma căruia celulele sunt reduse la homozigozitate. Studiile moleculare au relevat, însă, o situație aparent paradoxală: în regiunea 10q11, în care a fost stabilită localizarea genei MEN II, pierderea heterozigozității pentru markeri ADN nu a fost detectată decât în câteva cazuri; în schimb, în marea majoritate a tumorilor s-a înregistrat pierderea heterozigozității pentru markeri situați pe brațul scurt al cromozomului 1. Explicația s-a dovedit a fi simplă în momentul în care s-a descoperit că gena MEN II este identică cu protooncogena ret, care codifică un receptor cu activitate tirozinkinazică. Coroborarea acestor date a condus la construirea următorului scenariu: mutațiile ret produc hiperplazia preneoplazică a medularei tiroidiene și suprarenaliene (de notat că celulele C tiroidiene și cele ale medulosuprarenalei au origine comună: celulele crestei neurale); hiperplazia crește dimensiunile populației de celule-țintă, susceptibile să sufere transformarea malignă în

urma mutațiilor produse într-o genă de supresie a creșterii tumorale situată pe brațul scurt al cromozomului 1.

2.2.9.4.7. Sindromul Li-Fraumeni (SLF) este o boală cu transmitere dominantă și debut la vârsta tânără; se caracterizează prin agregarea familială a numeroase tipuri de cancere (sarcoame, tumori cerebrale, leucemii, tumori adrenocorticale, cancere de sân etc.). În familiile afectate au fost puse în evidență mutații ale genei supresoare p53, prezente în celulele liniei germinale, și interpretate ca reprezentând evenimentul primar, generator al predispoziției; al doilea eveniment — mutația alelică a genei p53 — declanșează creșterea tumorală.

2.2.9.4.8. Cancerul de sân. Existența formelor ereditare, cu transmitere autozomal dominantă, asociată sau nu cu cancere ovariene, este documentată de numeroase studii epidemiologice și genetice.

Analizele moleculare au evidențiat deleții genice, localizate cu precădere la nivelul cromozomului 17q12-21.

2.2.10. PROTEINELE CODIFICATE DE GENELE DE SUPRESIE A CREȘTERII TUMORALE SUNT PREZENTE ÎN TOATE COMPARTIMENTELE CELULEI NORMALE ȘI AU FUNCȚII VARIATE

Înțelegerea modului în care pierderea sau inactivarea GSCT contribuie la apariția fenotipului malign este obligatoriu condiționată de completa elucidare a funcțiilor pe care le îndeplinesc aceste gene în celulele normale. Obținerea de informații privind fiziologia normală a GSCT s-a dovedit a fi extrem de dificilă și a necesitat dezvoltarea unei strategii complexe, bazată pe principiile geneticii inverse, și a cărei etapă inițială o reprezintă cartografierea și clonarea genei prezumată a funcționa ca GSCT; urmează secvențierea genei clonate (descifrarea secvenței nucleotide) și stabilirea pe această cale a ordinii în care sunt dispuși aminoacizii în produsul ei proteic; prin programe asistate de calculator se caută eventuale analogii structurale cu gene și proteine ale căror roluri sunt cunoscute și care ar putea fi informative pentru funcția genei cercetate; în final, datele sunt testate prin metode experimentale.

Postularea existenței GSCT a fost rezultatul unor raționamente deductive ale căror premise le-au constituit observațiile privind efectele lipsei din genomul celular a unor secvențe ADN. Cartografierea și clonarea unor astfel de secvențe întâmpină dificultăți incomparabil mai mari decât cele cu care se confruntă clonarea oncogenelor. De aceea, dintr-un număr de peste 50 de GSCT (numărul a fost estimat considerându-se că fiecărui cancer ereditar îi corespunde o GSCT), numai 20 au fost cartografiate, iar dintre acestea, numai 10 au fost clonate.

Datele disponibile sunt, totuși, suficiente pentru a demonstra fără nici un echivoc că GSCT au roluri cruciale în fiziologia celulelor. Produșii lor proteici alcătuiesc rețele de semnalizare intracelulare cu funcții diametral opuse celor pe care le îndeplinesc rețelele formate din proteinele codificate de protooncogene.

GSCT funcționează, așadar, inhibând proliferarea și diferențierea celulară. Proteinele pe care le codifică rezidă în fiecare dintre comparti-

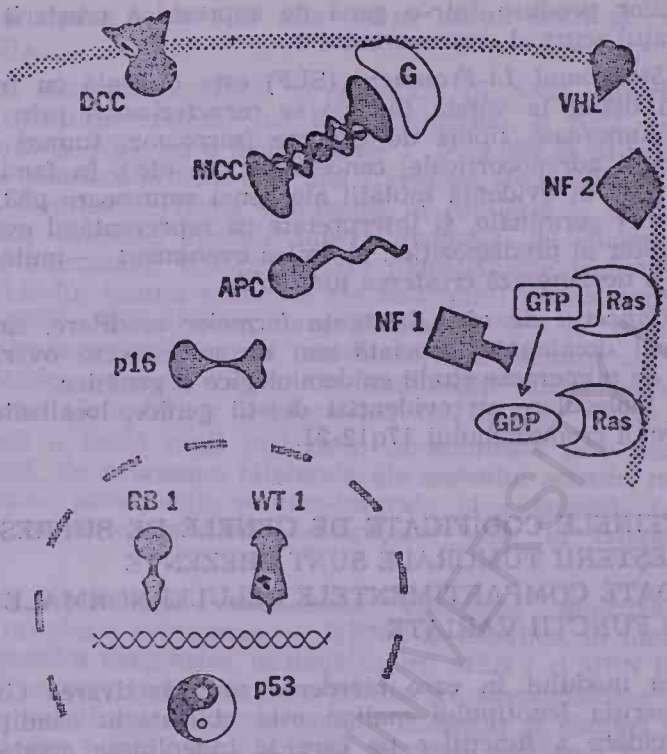


Fig. 2.17. Proteinele codificate de genele de supresie a creşterii tumorale sunt localizate la nivel intracelular.

mentele celulei, asigurând fluxul informaţiilor de la membrana plasmatică spre nucleu. Aceasta este şi ordinea în care vor fi prezentaţi, în cele ce urmează, produşii proteici ai GSCT (figura 2.17; vezi şi tabelul 2.16).

2.2.10.1. **Gena DCC** („Deleted in Colorectal Carcinoma"). Analiza, în carcinoamele colonice, a markerilor ADN ai regiunii q21 a cromozomului 18 a relevat, în peste 70% din cazuri, pierderi ale heterozigozităţii atribuite eliminării din genom a copiei normale a unei gene — denumită DCC — şi înlocuirii consecutive a acesteia cu o copie a alelei mutante. În adenoamele colonului, pierderi ale heterozigozităţii pentru gena DCC au fost notate doar ocazional, fapt care atestă că acest eveniment este strâns corelat cu transformarea malignă. Gena DCC codifică o proteină transmembranară de 190 kDaltoni, care prezintă un înalt grad de omologie structurală cu moleculele de adeziune celulară neuronale (N-CAM) şi cu alte glicoproteine de la suprafaţa celulei, ceea ce sugerează că proteina DCC ar funcţiona asigurând legarea celulelor la matricea extracelulară sau la un component al membranei bazale. Inactivarea genei DCC s-ar face astfel răspunzătoare de alterarea adezivităţii şi, implicit, de dobândirea capacităţii de metastazare. Proteinei DCC i s-a atribuit şi rolul de receptor al semnalelor din spaţiul extracelular care intervin în recunoaşterea intercelulară la nivelul epiteliului colonic sau în sistemul nervos.

Alterări ale genei DCC, constând în deleţii, inserţii, mutaţii punctiforme, sunt întâlnite în diferite tipuri de cancere (carcinom colorectal, carcinom de pancreas, tumori cerebrale), dar exclusiv în formele sporadice ale acestora.

2.2.10.2. **Gena MCC** („Mutated in Colorectal Cancer"). Este localizată pe braţul lung al cromozomului 5 (5q21); mutaţiile ei sunt, de asemenea, întâlnite exclusiv la bolnavii cu forme sporadice. Proteina codificată este situată pe faţa internă a membranei plasmatice şi prezintă un situs de legare a proteinelor G, similar cu cel aflat pe receptorul muscarinic pentru acetilcolină. Acest fapt sugerează că proteina MCC, legând proteinele G, poate bloca semnalizarea prin calea calciu/fosfoinozitide, dovedită a fi mitogenică în multe tipuri de celule. Inactivarea MCC ar determina derepresarea activităţilor de semnalizare şi stimularea consecutivă a diviziunilor celulare. Particularităţile proteinei MCC sunt sugestive pentru modul în care funcţionează; structura ei este de tip „coiled-coil" cu regiuni „kink and nod"; capetele moleculei MCC sunt domenii globulare care se interconectează printr-o serie de „bastoane" (alfa-helixuri), întrerupte de „noduri" (regiuni scurte, bogate în prolină); două molecule proteice MCC se răsucesc una în jurul celeilalte, formând un homodimer care, prin domeniile globulare sau prin „noduri", interacţionează cu alte proteine. Din familia proteinelor „coiled-coil" fac parte miozinele, keratinele, lamininele şi vimentina, toate caracterizate printr-o structură filamentoasă. De aceea, se consideră că dimerii MCC pot forma, prin asociere, oligomeri care intervin în organizarea spaţială a membranei celulare. Întrucât în ţesuturi proliferarea este dependentă de forma celulei şi de constrângerile fizice impuse de celulele vecine, se poate presupune că disrupţia unor structuri filamentoase consecutivă alterărilor genice este de natură să determine (într-un mod încă neelucidat) derepresarea semnalelor mitogenice.

2.2.10.3. **Gena VHL (Von Hippel-Lindau).** Este considerată a fi principala genă de supresie tumorală implicată în geneza carcinomului renal deoarece anomaliile ei au fost detectate într-un procent mare de cazuri, atât ereditare cât şi sporadice. Funcţia proteinei pe care o codifică, deşi incomplet cunoscută, pare să fie extrem de importantă, un argument în acest sens fiind gradul înalt de conservare în filogenie (secvenţa nucleotidică este aproape identică la om, ariciul de mare şi *Drosofila*). Omologia structurală cu o secvenţă repetitivă pentamerică a unei glicoproteine de suprafaţă prezentă la *Tripanosomatidae* sugerează că produsul proteic al genei VHL are rol în adezivitatea celulară şi în transducţia semnalelor.

2.2.10.4. **Gena APC** („Adenomatous Polyposis Coli"). Este localizată pe braţul lung al cromozomului 5 (5q21). Mutaţiile germinale ale acestei gene au fost evidenţiate la bolnavii cu polipoză adenomatoasă familială şi cu sindrom Gardner, iar cele somatice, în cazurile sporadice de cancere colonice, gastrice, pancreatice şi pulmonare. Proteina codificată prezintă, la fel ca şi proteina DCC, un segment cu omologie pentru situsul de legare a proteinelor G din receptorul muscarinic al acetilcolinei, şi o structură de tip „coiled-coil" care îi permite interacţiunea cu alte proteine. Funcţia acestei proteine este necunoscută (vezi 2.2.17.2.2.). Totuşi, se pare

că proteinele APC și MCC, ambele modificate structural în tumorile rectocolonice sporadice, interacționează în cadrul aceleiași căi de reglare a creșterii și proliferării celulare.

2.2.10.5. **Gena NF1** („Neurofibromatosis 1"). Este situată pe cromozomul 17q11 și are o lungime de 360 Kbaze. Analiza secvenței aminoacidice a produsului proteic — având în alcătuirea sa peste 2 400 aminoacizi — a relevat similarități structurale cu trei proteine care interacționează cu produsul protooncogenei ras: proteina GAP de la mamifere (care amplifică activitatea GTP-azică intrinsecă a p21Ras, implicată în dezactivare). și proteinele IRA1 și IRA2 de la drojdii (care inhibă activitatea Ras1). Aceste similitudini sugerează că proteina NF1 este implicată în calea de semnalizare Ras care intervine în reglarea proliferării celulare (vezi 2.2.11).

O particularitate a genei NF1 o constituie prezența, în secvența nucleotidică a unuia dintre intronii din alcătuirea sa, a trei gene distincte: EVI2A, EVI2B și OMGP. Prima codifică o proteină asemănătoare cu molecula neuronală de adezivitate celulară (NCAM); produșii proteici ai celorlalte două sunt polipeptide cu domenii transmembranare, exprimate nu numai în celulele sistemului nervos central (în care își au originea tumorile din NF1), ci și în celulele sistemului hematoformator. Acest aranjament complex de trei gene înglobate într-o a patra sugerează o reglare transcripțională unică (control al exprimării). Este posibil ca diferențele fenotipice din neurofibromatoza 1 să se datoreze mutațiilor genei NF1 sau celor ale genelor înglobate. De exemplu, alterările genei EVI2A ar putea fi răspunzătoare de incidența crescută a leucemiei mieloblastice la bolnavii cu NF1. Faptul că mutațiile oricăruia dintre cele 360 000 de nucleotide, inclusiv ale celor situate în afara regiunii GAP, care alcătuiesc gena NF1 pot avea semnificație patogenică este atestat și de gradul înalt de conservare a secvenței nucleotidice la specii foarte îndepărtate filogenetic.

2.2.10.6. **Gena NF2** („Neurofibromatosis 2"). Este localizată pe brațul lung al cromozomului 22 (22q12) și codifică o proteină de 69 kDaltoni, denumită merlina (de la moesin, ezrin-, radixin-like), prezentă în țesuturi variate, inclusiv în sistemul nervos central. În profida omologiilor structurale cu moesina, ezrina și radixina — proteine implicate în comunicarea între membrana plasmatică și citoschelet, mecanismul de acțiune al merlinei este încă neelucidat. Nu se cunoaște nici modul în care mutațiile NF2 generează fenotipul neoplazic. Este, totuși, de presupus că proteina defectivă ar putea să deregleze creșterea celulară prin alterarea transducției semnalelor, prin reducerea gradului dependenței de ancorare sau prin dezorganizarea ciclului celular.

2.2.10.7. **Gena p16.** Este localizată pe cromozomul 9p21 și codifică o proteină ($p16^{INK1}$) cu rol inhibitor asupra unor kinaze implicate în progresiunea prin faza S a ciclului celular (kinazele dependente de ciclina D-CDK 4 și 6). Nivelul exprimării genei p16 variază în cursul ciclului celular: transcrierea este inhibată în G1 de proteina RB, dar acest efect negativ dispare la începutul fazei S, o dată cu inactivarea prin fosforilare

a proteinei p105RB. În celule se acumulează $p16^{INK1}$ și, consecutiv, se reduce viteza de înaintare a celulelor prin faza S. Dispariția p16 este urmată de abolirea unui semnal inhibitor al proliferării celulare. Deleţiile sau mutaţiile somatice ale GSCT p16 sunt identificate într-un spectru larg de carcinoame sporadice (esofagiene, pancreatice etc.), iar alterările în celulele germinale se înregistrează în melanoamele familiale (se consideră că locusul p16 este, probabil, identic cu locusul MLM de predispoziţie la acest tip de cancer ereditar).

2.2.10.8. **Gena WT1** („Wilms Tumor 1"). Este singura dintre cele trei gene implicate în apariția tumorii Wilms care a fost clonată. Locusul genic se află pe braţul scurt al cromozomului 11 (11p13). Deleţii şi mutaţii germinale ale genei WT1 au fost detectate la bolnavi cu malformaţii urogenitale şi cu sindroame care predispun la dezvoltarea tumorii Wilms (sindroamele Denys—Drash, Beckwith—Wiedemann şi WAGR) (tabelul 2.17), iar mutaţii somatice au fost observate în unele cazuri sporadice

Tabelul 2.17

Sindroame congenitale asociate cu tumora Wilms

Sindrom	Caracteristici	Frecvenţa tumorii Wilms	Locus cromozomial	Antioncogena	Modificarea genetică
WAGR	Tumoră Wilms, aniridia, malformaţii genitourinare, retard mental	>30%	11p13	WT1	Deleţia unei alele
Denys-Drash	Tumoră Wilms, nefropatie, intersexualitate	>90%	11p13	WT1	Mutaţii punctiforme
Beckwith-Wiedemann	Macroglosie, organomegalie, hemihipertrofie, hipoglicemie neonatală, tumori embrionare	< 5%	11p15	WT2	Duplicaţia alelei paterne

de tumoră Wilms şi în leucemii acute mieloblastice. Proteina codificată conţine patru domenii „zinc finger", ceea ce indică funcţia de factor de transcriere, şi este prezentă într-un spectru îngust de ţesuturi şi organe (rinichi, aparat genital, splină). Un aspect notabil este cel al coexistenţei de domenii reglatoare care funcţionează fie ca activatori, fie ca supresori ai aceleaşi gene-ţintă. Exprimarea factorului de transcriere WT1 suprimă activitatea genelor inductoare ale creşterii, cum ar fi EGR1 („early growth response 1"), IGF2 („insulin-like growth factor 2") sau PDGFA („plateled derived growth factor A chain"). Recent s-a demonstrat că acţiunea supresoare se datorează asocierii cu proteina P53. Cel mai bine studiat este antagonismul funcţional dintre factorii de transcriere WT1 şi EGR1, între care există o omologie structurală de peste 60%. Acţionând la nivelul

aceleiaşi secvenţe ADN reglatoare, WT1 determină inhibarea, iar EGR1 — activarea transcrierii genelor structurale controlate de secvenţa respectivă. Gena EGR1 este exprimată ubicuitar şi face parte din categoria celor mai rapid activate gene ca răspuns la acţiunea de stimulare a creşterii şi proliferării celulare exercitată de factorii serici. În celulele precursoare renale, activitatea ei este antagonizată de cea a GSCT WT1, ceea ce determină comutarea de pe programul de proliferare pe cel de diferenţiere (în tipurile celulare în care WT1 este nefuncţională, efectul EGR1 este antagonizat de alte gene, a căror natură este încă puţin cunoscută). Se explică astfel de ce pierderea ambelor alele WT1 în celulele renale se soldează cu accelerarea proliferării şi, consecutiv, cu apariţia tumorilor.

2.2.10.9. **Gena Rb** („Retinoblastoma"). Este localizată pe braţul lung al cromozomului 13 (13q14), cuprinde 180 Kbaze, şi codifică o proteină nucleară de 105 kDaltoni, denumită p105RB (p Rb). Produsul proteic există sub două forme: fosforilată şi nefosforilată. Aceasta din urmă acţionează la nivelul punctului de restricţie situat la graniţa dintre fazele G1 şi S ale ciclului celular.

Gradul de fosforilare a p105RB variază pe parcursul ciclului celular, fiind maxim la începutul fazei S, şi minim după completarea mitozei. Acesta este motivul pentru care se consideră că doar forma nefosforilată are capacitatea de a inhiba proliferarea celulară. Dispariţia sau inactivarea proteinei în celulele tumorale determină suprimarea unui punct de control al ciclului celular, urmată de succedarea neîntreruptă a mitozelor.

Localizarea nucleară şi capacitatea de legare la ADN conduc la concluzia că p105RB funcţionează ca factor de transcriere, iar exprimarea ubicuitară indică participarea la un eveniment celular esenţial. În această situaţie apare ca un paradox spectrul limitat de neoplasme în care se pot decela pierderi alelice ale genei Rb: retinoblastoamele, osteosarcoamele ereditare, unele forme sporadice de neoplasme pulmonare, vezicale, mamare, şi unele leucemii acute. Explicaţia rezidă în faptul că exprimarea genei Rb este dependentă de stadiul de dezvoltare ontogenetică şi de programul de creştere al celulei. De exemplu, în retinoblaştii şi osteoblaştii embrionari proteina RB este absentă, nivelul ei crescând însă în celulele angajate pe calea diferenţierii — retinocite şi osteocite intermediare. Dispariţia p105Rb din aceste celule împiedică desfăşurarea în continuare a programului de diferenţiere şi le blochează în compartimentul proliferativ, făcând posibilă acumularea mutaţiilor adiţionale. Pe de altă parte, în enterocitele umane deleţia alelică a genei Rb nu se însoţeşte de dobândirea potenţialului malign deoarece celulele purtătoare sunt eliminate în lumenul intestinal pe măsură ce ajung la vârful criptelor Lieberkühn.

Modelul molecular al malignizării prin pierderea GSCT Rb este prezentat în paragraful 2.2.17.

2.2.10.10. **Gena BRCA1** („Breast cancer 1"). Este cea mai recent clonată GSCT şi se află pe braţul lung al cromozomului 17 (17q21). Codifică o proteină cu rol de factor de creştere care este exprimată în timus, testicul, ovar şi glandele mamare. Nu i s-au putut atribui roluri în geneza formelor sporadice de tumori mamare şi ovariene, în care gena apare a fi nealterată. În schimb, deleţiile alelice ale BRCA1 sunt prezente în 50% din

cancerele ereditare (acestea reprezentând 5% din totalul cazurilor). Se consideră că în etiopatogenia diferitelor tipuri de neoplasme mamare sunt implicate numeroase alte gene supresoare (BRCA 2, 3, 4, 5 şi, probabil, 6).

2.2.10.11. **Gena p53** („Protein 53 kDaltoni"). Datorită rolului central al acestei gene în tumorigeneza umană, datele privitoare la mecanismul ei de acţiune vor fi prezentate într-un paragraf separat (2.2.14).

În afară de GSCT care au fost caracterizate din punct de vedere molecular, există şi unele, cu localizare cromozomială cunoscută, dar încă neclonate. Dintre acestea pot fi menţionate:

NB1 (1p36) (în neuroblastoame); MCM (9p21) (în melanoame); MEN1 (11q13) (în sindromul neoplaziilor endocrine multiple tip 1); BCNS (9q31) (în meduloblastoame şi carcinoame cutanate); LC1 (3p14-21) (în carcinomul pulmonar cu celule mici); RCC (3p14) (în carcinoamele renale). Au mai fost identificate o serie de situsuri cromozomiale la nivelul cărora se află secvenţe candidate la funcţia de gene supresoare şi a căror implicare în tumorigeneza umană este în curs de evaluare (integrina-alfa 6, alfa-inhibitina, inhibitorul tisular al metaloproteinazelor etc.).

Clonată şi caracterizată cu câteva luni în urmă, gena ATM („Ataxia-Telangiectasia, Mutated") îndeplineşte în celule funcţii complexe şi foarte importante, dintre care unele asemănătoare cu cele ale antioncogenelor. ATM este localizată pe braţul lung al cromozomului 11 (11q22-23). Transcriptul ARN principal al acestei gene are o lungime de 12 kbaze. O porţiune de 5,9 kbaze codifică o proteină similară fosfatidil-inozitol-3'-kinazelor, enzime implicate în transducţia semnalelor şi care, adăugând grupări fosfat moleculelor lipidice, mediază răspunsurile celulare la factorii mitogenici, la cei stimulatori ai diferenţierii, precum şi la insulină. Un alt domeniu al proteinei ATM prezintă similitudini structurale cu enzime cunoscute a interveni în prezervarea integrităţii genomului, în controlul ciclului celular şi în desfăşurarea procesului de recombinare meiotică. În cazul iradierii cu radiaţii ionizante sau ultraviolete, proteina ATM normală blochează tranzitul celulelor prin punctele de restricţie G1-S şi G2-M pentru a permite repararea completă a leziunilor ADN. Inactivarea mutaţională a ATM explică, aşadar, atât sensibilitatea exagerată la radiaţiile ionizante, cât şi predispoziţia la cancere — trăsături prezente nu numai la bolnavii cu ataxia-telangiectazia, ci şi la heterozigoţii pentru gena ATM defectivă.

2.2.11. GENELE DE SUPRESIE A CREŞTERII TUMORALE SUNT INDISPENSABILE SUPRAVIEŢUIRII CELULELOR NORMALE

Organismele multicelulare şi-au dezvoltat sisteme complexe de comunicare între celulele care le alcătuiesc. Prin intermediul acestor sisteme se asigură reglarea dezvoltării şi organizării ţesuturilor, controlul creşterii şi proliferării, coordonarea activităţii celulelor, ţesuturilor şi organelor.

Celulele comunică între ele prin semnale chimice care operează la distanţă (calea endocrină), precum şi prin molecule cu rol de mediatori locali, acestea influenţând celulele aflate în strictă vecinătate (calea paracrină). Există şi posibilitatea autoreglării prin elaborarea de către propriul

aparat proteinosintetizator a unor molecule-semnal intrinseci (calea autocrină).

Pe căile de comunicare circulă semnale cu rol pozitiv (stimulatoare) sau negativ (inhibitoare) în reglarea diferitelor procese și activități celulare. De la nivelul receptorilor membranari, semnalele extrinseci sunt propagate la efectori printr-un ansamblu de modificări biochimice secvențiale ale elementelor care constituie releele de semnalizare intracelulară. În paragraful 2.2.4 au fost prezentate circuitele intracelulare prin care sunt transmise semnalele cu rol stimulator al creșterii și proliferării. S-a arătat că releele acestor circuite sunt reprezentate de produșii proteici ai protooncogenelor; substituirea acestora cu oncoproteine activează constitutiv calea de semnalizare care, prin generarea spontană de stimuli mitogenici, conferă celulelor neoplazice autonomie proliferativă.

În ce privește transducția semnalelor negative, de inhibare a creșterii celulare, numeroase argumente de ordin teoretic și experimental susțin teza că aceasta s-ar realiza prin circuite de semnalizare în a căror alcătuire intră produșii proteici ai GSCT.

Proteinele codificate de GSCT sunt localizate pe ambele fețe ale membranei celulare, în citoplasmă, precum și în interiorul nucleului, adică pe întregul traseu al fluxului informațional intracelular. S-ar putea conchide că în punctele nodale ale rețelelor de semnalizare se află atât produșii proteici ai protooncogenelor, cât și cei ai GSCT. Altfel spus, fiecare releu ar fi alcătuit din câte o pereche de molecule cu roluri diametral opuse: unele ar realiza transmiterea semnalelor, iar altele ar bloca fluxul de informații.

Nu este exclusă nici posibilitatea existenței unor rețele de semnalizare distincte, proprii fiecărei categorii de stimuli. Ajunși la nivel nuclear, stimulii ar acționa fie asupra aceluiași substrat — dar cu efecte antagoniste —, fie asupra unor substraturi diferite. Figura 2.18 prezintă schematic cele două posibilități arătând că ele nu sunt mutual exclusive, ci pot coexista în aceeași celulă.

Răspunsul celulelor la semnalele inhibitoare din mediu se poate manifesta sub una din următoarele forme: 1) părăsirea ciclului celular, cel mai frecvent prin punctul de restricție de la sfârșitul perioadei G1 și intrarea implicită în stadiul de repaus proliferativ denumit G0; 2) diferențierea post-mitotică — proces invariabil însoțit de pierderea capacității proliferative; 3) senescența și/sau moartea celulară programată (apoptoza). În celulele normale, aceste forme de răspuns sunt mediate de GSCT care, în majoritatea lor, funcționează inhibând genele promotoare ale proliferării sau activând genele inductoare ale diferențierii.

Mecanismele prin care GSCT își exercită aceste funcții sunt multiple și complicate. Unul dintre acestea comportă antagonizarea acțiunii unor protooncogene. Modalitățile de realizare pot fi indirecte — neimplicând interacțiunea fizică a produșilor proteici, sau directe — care comportă contactul nemijlocit al celor două tipuri de proteine. Prima situație este exemplificată de p105Rb care, în forma nefosforilată blochează tranziția G1→S. Efectul se datorează complexării unor factori de transcriere (E2F) care activează gene importante pentru progresiunea prin ciclul celular. Printre acestea figurează protooncogena N-myc, supraexprimată în retina fetală și în celulele retinoblastomului și protooncogena fos. În acest mod, p105Rb blochează transcrierea unor protooncogene necesare inițierii proliferării ca răspuns la acțiunea mitogenilor din mediu; absența din celulele

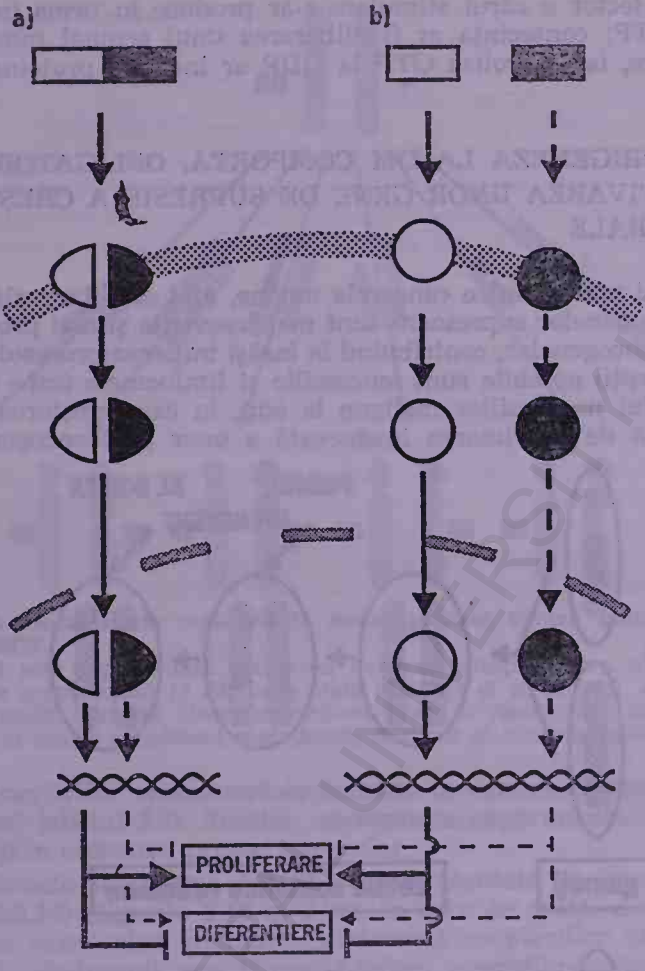


Fig. 2.18. Posibilitățile de interacțiune între produșii proteici ai protooncogenelor și cei ai GSCT.
(a) interacțiune directă în cadrul aceleiași rețele de semnalizare; (b) interacțiune indirectă între rețele paralele. Ambele tipuri de interacțiuni se produc în cadrul aceleiași celule. Simboluri: figurile pline — proteine codificate de GSCT; figurile goale — proteinele codificate de protooncogene; săgeata — stimulare; bara — inhibare.

neoplazice a p105Rb ar crea condiții pentru decuplarea de reglatorii negativi a procesului de transcriere a unor protooncogene, simulând efectele activării oncogenice.

Un exemplu de interacțiune directă este cel al complexării proteinelor NF1 și p21Ras. NF1 poartă un domeniu cu funcție GAP („GTP-ase activating protein") care crește de aproximativ 1 000 de ori rata hidrolizei formei active p21Ras-GTP, transformând-o rapid în forma inactivă p21 Ras-GDP. NF1 ar putea regla activitatea proteinei p21Ras prin inhibare („down regulation"), interceptând forma activă înainte ca aceasta să aibă posibilitatea de a interacționa cu molecula efectoare. Alternativ, NF1 ar

putea fi un efector a cărui stimulare s-ar produce în urma interacţiunii cu p21Ras-GTP; consecinţa ar fi eliberarea unui semnal mitogenic sau de diferenţiere, iar hidroliza GTP la GDP ar inactiva proteina p21 Ras.

2.2.12. TUMORIGENEZA LA OM COMPORTĂ, OBLIGATORIU, INACTIVAREA UNOR GENE DE SUPRESIE A CREŞTERII TUMORALE

În cele mai multe dintre cancerele umane, atât ereditare cât şi sporadice, alterările genelor supresoare sunt mai frecvente şi mai precoce decât cele ale protooncogenelor, contribuind la însăşi iniţierea procesului malign. Singurele excepţii notabile sunt leucemiile şi limfoamele (care reprezintă 10% din totalul neoplaziilor maligne la om), în care creşterea tumorală este declanşată de exprimarea inadecvată a unor protooncogene, conse-

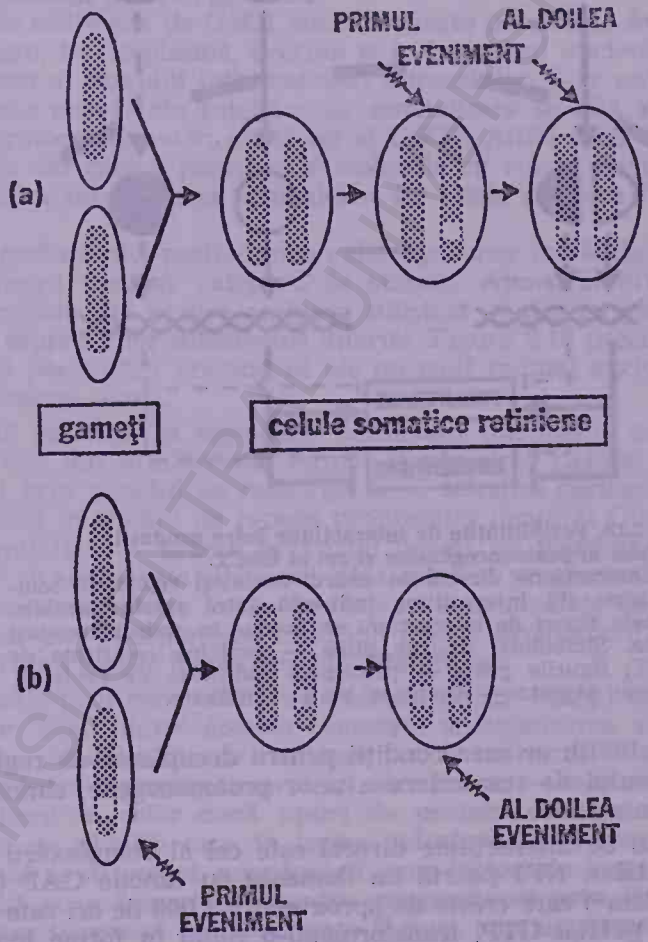


Fig. 2.19. Dezvoltarea retinoblastomului.
(a) forma sporadică; (b) forma ereditară. Sunt reprezentaţi cromozomii 13 normali (coloraţi omogen) şi cromozomii 13 cu alela Rb inactivată (zona necolorată).

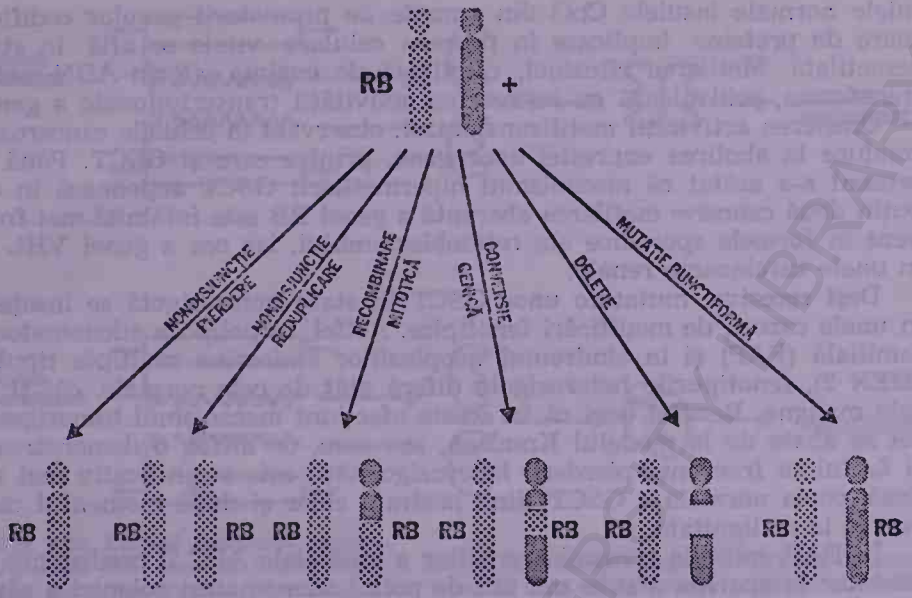


Fig. 2.20. Mecanismele reducerii la homozigozitate pentru mutația recesivă a unei GSCT.
În figură este reprezentată pierderea heterozigozității pentru alela normală Rb de pe cromozomul 13 (RB este alela mutantă și cu semnul + este notată alela normală). Oricare dintre mecanisme poate fi răspunzător de producerea celui de al doilea eveniment mutațional, inițiator al tumorigenezei.

cutivă rearanjărilor cromozomiale formate în celulele sistemului hematopoietic (vezi tabelul 2.8). Similar, oncogeneza experimentală se realizează prevalent prin activarea protooncogenelor.

Mecanismele inactivării GSCT sunt prezentate și în alte paragrafe (2.2.9, și 2.2.14) (figurile 2.19 și 2.20), în care se arată, de asemenea, că majoritatea cancerelor ereditare (sindromul neoplaziilor endocrine multiple tip 1, sindromul von Hippel-Lindau, neurofibromatoza tip 2, sindromul Li-Fraumeni, sindromul familial al cancerelor de sân/ovar, retinoblastomul) se dezvoltă ca urmare a inactivării secvențiale a celor două copii ale unei GSCT: primul eveniment mutațional, produs în celulele liniei germinale ale unuia dintre părinți, sau propagat de-a lungul generațiilor, determină predispoziția, iar al doilea — produs în celulele somatice ale individului care a moștenit predispoziția — inițiază dezvoltarea neoplaziei. Dat fiind caracterul recesiv al GSCT, prezența unei singure copii funcționale nu impietează asupra funcționalității celulei și este suficientă pentru a represa proliferarea neoplazică.

Dintre multiplele mecanisme prin care se poate realiza pierderea heterozigozității pentru o GSCT, unul — recent identificat — reține în mod particular atenția deoarece se înscrie în fenomenul general al alterării stării de metilare a ADN, caracteristic celulelor canceroase.

Acest mecanism constă în hipermetilarea unor regiuni caracterizate prin conținutul înalt în citozină și guanină — denumite insule CpG (formate din 1 000—2 000 de repetări dinucleotidice) — situate la capătul 5' (reglator) al tuturor unităților transcripționale din genomul nuclear. În ce-

lulele normale insulele CpG din amonte de promotorii genelor codificatoare de proteine implicate în procese celulare vitale se află în stare nemetilată. Metilarea citozinei, catalizată de enzima citozin-ADN-metiltransferaza, echivalează cu represarea activității transcripționale a genei.

Creșterea activității metiltransferazei, observată în celulele canceroase, conduce la abolirea expresiei unor gene, printre care și GSCT. Până în prezent s-a arătat că mecanismul hipermetilării GSCT acționează în cel puțin două cancere: metilarea aberantă a genei RB este întâlnită mai frecvent în formele sporadice ale retinoblastomului, iar cea a genei VHL — în unele carcinoame renale.

Deși recesive, mutațiile unor GSCT în stare heterozigotă se însoțesc, în unele cazuri, de modificări fenotipice. Astfel, în polipoza adenomatoasă familială (FAP) și în sindromul neoplaziilor endocrine multiple tipul 2 (MEN 2), fenotipurile heterozigote diferă atât de cele normale, cât și de cele maligne. Rezultă deci că în aceste afecțiuni mecanismul tumorigenezei se abate de la modelul Knudson, așa cum, de altfel, o demonstrează și faptul că frecvența pierderii heterozigozității este semnificativ mai redusă, copia normală a GSCT fiind păstrată chiar și după momentul conversiei la malignitate.

În FAP, mutația transmisă ereditar a unei alele APC îl predispune pe purtător la apariția a sute sau mii de polipi adenomatoși colonici a căror histologie are aspect benign. Mutația determină doar expansiunea compartimentului proliferativ, deci creșterea probabilității producerii unor alte modificări genice.

Gena predispoziției la sindromul MEN2 este localizată pe brațul lung al cromozomului 10(10q11), dar procentul de pierderi ale heterozigozității pentru markeri ADN specifici acestei regiuni este foarte redus. Pe de altă parte, în feocromocitoamele și carcinoamele medulare tiroidiene ale bolnavilor cu MEN2 au fost depistate pierderi ale heterozigozității pentru markeri situați pe alți cromozomi decât 10q, și anume 1p, 3p, 11, 17p, și 22q. Explicația este una singură: alterarea transmisă ereditar a GSCT de pe cromozomul 10 reprezintă primul eveniment mutațional, acesta fiind răspunzător de formarea focarelor de hiperplazie în organele neuroendocrine afectate; apariția fenotipului malign este însă condiționată de achiziția unor leziuni genetice adiționale.

În determinismul acestor situații apare posibilă intervenția a trei mecanisme genetice diferite:

a) *Efectul dominant negativ,* care definește acțiunea neutralizantă a unei proteine anormale, sintetizată de alela mutantă, asupra corespondentei normale, modificată de alela omologă sau de către o altă genă normală (figura 2.21). Un astfel de efect este atribuit unor mutații sau deleții interesând doar una dintre copiile genei p53, dar care mimează fenotipic consecințele inactivării ambelor alele. Explicația constă în dominanța negativă exercitată de forma anormală a P53 asupra celei normale, consecință a formării de dimeri inactiv funcțional, alcătuiți dintr-un polipeptid normal și unul modificat structural; la nivel fenotipic, efectul este identic cu cel al prezenței exclusive a proteinelor mutante. O interacțiune similară se produce și în cazul proteinei mutante APC, prezentă în chiar cei mai mici polipi colonici, și răspunzătoare de anihilarea efectelor proteinei APC normale.

b) *Efectul de dozaj genic* descrie variația intensității activității biologice a proteinei în funcție de nivelul exprimării genei care o codifică (în

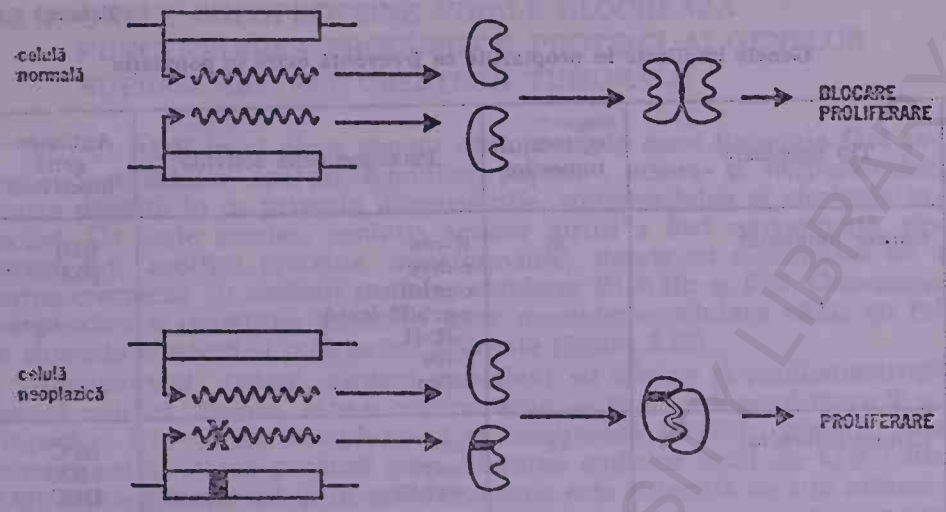


Fig. 2.21. Efectul dominant negativ.
Apariția unei mutații într-o copie a unei GSCT (zona neagră) determină sinteza unei proteine alterată structural (zona neagră) care complexează proteine normală într-un mod diferit față de situațiile obișnuite, blocându-i situsurile funcționale (zona indentată). Rezultatul îl constituie dispariția efectului antiproliferativ exercitat în celula normală.

particular — o genă supresoare). Cauza o constituie existența unei relații neliniare între concentrația intracelulară a proteinei codificate și efectele biologice ale acesteia. De exemplu, o scădere de două ori a densității proteinei DCC pe suprafața celulară, datorată reducerii la jumătate a expresiei genice prin nefuncționarea uneia dintre cele două alele, determină o scădere de 30 de ori a adezivității celulare. Efectul de dozaj genic explică acțiunea dominantă a alelei mutante APC în cancerul colorectal sporadic și în FAP, sau a WT1 în tumora Wilms, în care prezența copiei normale nu poate suplini dereglările consecutive existenței alelei mutante.

c) *Expresia neechivalentă a unei alele* este consecința amprentării genomice (vezi 2.2.17.1).

În cancerele sporadice modelul tumorigenezei este cu mult mai complex: prima mutație are loc la nivelul unei GSCT și determină inițierea procesului neoplazic. Ea este urmată de o cascadă de evenimente mutaționale care se produc la nivelul atât al GSCT cât și al protooncogenelor. În unele situații, evenimentul inițial interesează o genă de stabilitate (antimutatoare), ceea ce conduce la creșterea exagerată a instabilității genomice și, implicit, a mutabilității protooncogenelor și a GSCT (vezi 2.2.16).

În tumorile solide neereditare mecanismele moleculare ale abolirii activității GSCT sunt aceleași cu cele care funcționează în cancerele ereditare; numărul anomaliilor genice identificate este în continuă creștere (tabelul 2.18).

Dobândirea fenotipului malign reclamă inactivarea mai multor GSCT, cerință întru totul explicabilă dacă se are în vedere faptul că produșii proteici ai acestora intervin în reglarea unor procese celulare multiple, implicate în realizarea normală a tuturor funcțiilor vitale. Alternativ,

Tabelul 2.18

Genele implicate în neoplaziile cu frecvenţă mare în populaţie

Tip neoplazie	% totalul tumorilor	Protooncogena activată	Antioncogena inactivată
Cancer pulmonar	15	K-ras c-myc c-erbB1 c-erbB2 (neu) c-Raf1 c-fos c-jun	RB1 p53
Cancer colorectal	15	ras c-myc c-erbB2	APC MCC DCC p53
Cancer mamar	15	c-erbB2 c-myc int 2 bcl 1 (PRAD1) FGFR 1, 2 şi 4	BRCA 1 p53 RB
Cancer prostată	10	K, H, N-ras c-myc c-sis c-erbB2	p53 RB
Cancer vezică urinară	5	ras	p53 RB
Cancer endometru	3	K-ras	p53 DCC

proteinele codificate de mai multe GSCT pot interveni în controlul unui acelaşi proces, dar ca răspuns la semnale diferite.

În virtutea coparticipării lor la constituirea unor căi de semnalizare intracelulară (vezi 2.2.9), unele GSCT îşi pot complementa funcţiile dacă acestea au fost deteriorate ca urmare a unor mutaţii inactivatoare. Există celule tumorale — cum sunt cele ale liniei SAOS2 — în care atât gena Rb cât şi gena p53 sunt inactivate. Transfecţia uneia dintre cele două alele normale (Rb sau p53) supresează proliferarea aberantă, ceea ce demonstrează că apariţia fenotipului malign este condiţionată de inactivarea ambelor gene. Experimentele de acest tip au produs dovezile de necontestat ale cooperării GSCT: cel puţin două GSCT diferite îşi pot suplini reciproc alterările funcţionale, abolind astfel capacitatea tumorigenică a celulelor transformate malign. De precizat că în oncogenetică, termenul de cooperare este utilizat şi pentru a defini acţiunea concertată a alterărilor GSCT şi ale protooncogenelor în cursul progresiunii tumorale.

2.2.13. UNELE ONCOPROTEINE VIRALE BLOCHEAZĂ FUNCȚIONAREA PRODUȘILOR PROTEICI AI GENELOR SUPRESOARE ALE CREȘTERII TUMORALE

Virușii ADN în al căror genom sunt prezente gene tumorale fără corespondent celular aparțin familiilor papova-, adeno- și herpesviridae, foarte diferite în ce privește dimensiunile, complexitatea și strategia infecției. Cu toate acestea, evoluția acestor virusi a fost convergentă, deoarece toți codifică proteine transformante, dotate cu capacitatea de a forma complexe cu aceleași proteine celulare: P105 Rb și P53. Consecința complexării o constituie alterarea unor mecanisme celulare vitale cu rol în supresia creșterii și proliferării aberante (figura 2.22).

Adenovirușii umani, virusul vacuolant 40 simian și papilomavirușii umani codifică, fiecare, câte o oncoproteină — E1A, antigenul mare T și, respectiv, E7 — care complexează și inactivează P105Rb celulară. Este mimată astfel starea produsă prin alterarea ambelor còpii ale GSCT Rb. Atât într-o situație cât și în cealaltă, celula este eliberată de sub influențele inhibitorii exercitate asupra multiplicării. Legarea oncoproteinelor virale se realizează în aceeași regiune a PRb (denumită „buzunare de legare a oncoproteinelor") care este găsită a fi invariabil alterată structural și în tumorile apărute independent de infecția virală. De aceea se consideră că această regiune este implicată în legarea unor proteine ce-

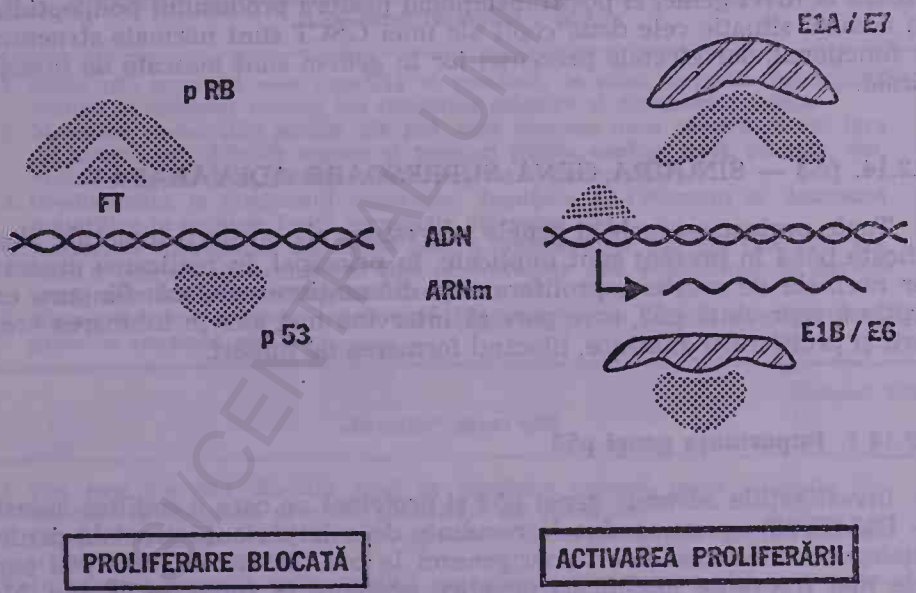


Fig. 2.22. Inactivarea proteinelor P53 și p RB de către oncoproteinele virușilor ADN are ca efect stimularea proliferării celulare.
În celula normală pRB sechestrează un factor necesar proliferării celulare (factor de transcriere — FT), iar P53 reprezează direct transcrierea unei gene necesare proliferării. Infecția virală (cu papilomavirus sau adenovirus, determină apariția în celulă a două tipuri de oncoproteine virale: E1A respectiv E7, blochează pRB eliberând factorul de transcriere necesar proliferării, iar E1B, respectiv E6 complexează P53 permițând desfășurarea activității FT. În cazul SV 40, o singură oncoproteină (antigenul mare T) are capacitatea de a inactiva ambele proteine codificate de GSCT p53 și Rb.

lulare care mediază efectul supresor al P105 Rb. Ocuparea locusului de legare prin complexarea cu oncoproteina virală exclude posibilitatea interacțiunii normale cu efectorii celulari, la fel ca și alterarea consecutivă mutațiilor. O descoperire importantă pentru înțelegerea modului în care funcționează P105 Rb a fost aceea că toate cele trei oncoproteine virale se leagă numai la forma nefosforilată, care este prezentă exclusiv în stadiul G0 și în faza G1 a ciclului celular. Concluzia a fost că pRb acționează ca supresor al creșterii și proliferării doar în perioada de început a ciclului celular.

Proteina P53 a fost prima dată identificată ca o fosfoproteină nucleară legată de antigenul mare T al SV40. Ulterior s-a dovedit că și proteinele E1B (adenovirus) și E6 (virusul papiloma) complexează cu P53, determinând inactivarea acesteia și, totodată, pierderea capacității de a inhiba proliferarea celulară. Recent s-a constatat că oncoproteina E6 codificată de virușii papiloma umani tipurile 16 și 18, care se asociază cu neoplaziile de col uterin, au capacitatea de a se lega la P53, proprietate care lipsește la tipurile 6 și 11, asociate cu condiloamele benigne. Aceste date demonstrează că proprietățile biologice ale virușilor ADN oncogeni se corelează cu capacitatea de a se asocia cu un reglator negativ al proliferării celulare.

În concluzie, complexarea proteinelor codificate de GSCT de către oncoproteinele virale se prezintă ca un mecanism particular de inactivare a efectelor GSCT. Particularitatea constă în faptul că acțiunea nu se realizează la nivel genic, ci posttranslațional (asupra produsului polipeptidic). În această situație cele două còpii ale unei GSCT sunt normale structural și funcțional, dar efectele prezenței lor în genom sunt mascate de infecția virală.

2.2.14. p53 — SINGURA GENĂ SUPRESOARE ADEVĂRATĂ?

Toate protooncogenele și genele supresoare ale creșterii tumorale identificate până în prezent sunt implicate, în principal, în realizarea proceselor normale de creștere, proliferare și diferențiere celulară. Singura excepție o reprezintă p53, care pare să intervină mai ales în inhibarea creșterii și proliferării anarhice, blocând formarea de tumori.

2.2.14.1. Importanța genei p53

Investigațiile adresate genei p53 și proteinei pe care o codifică aceasta — P53 (TP53) — au condus la rezultate de o importanță crucială pentru înțelegerea mecanismelor tumorigenezei la om. Mutațiile genei p53 sunt cele mai frecvente modificări genetice prezente în tumorile umane. Mai mult de jumătate din totalul cancerelor și aproximativ două treimi din carcinoame prezintă mutații la nivelul locusului p53. Au fost descrise circa 2 500 de mutații, identificate în peste 30 de tipuri morfoclinice diferite de tumori umane. Scenariul inactivării celor două còpii ale genei p53 este, în general, același. Primul eveniment este reprezentat de o mutație punctiformă cu sens greșit („missense") care determină o substituție aminoacidică în molecula P53: mutația crește semnificativ timpul de înjumătățire a proteinei, ceea ce duce la acumularea intracelulară a unor

cantități mari de P53 modificată structural. Al doilea eveniment — cel care determină pierderea heterozigozității — este reprezentat cel mai adesea de deleția alelei normale sau, mai rar, de conversia genică.

Istoricul descifrării funcțiilor genei p53 se constituie într-un exemplu cât se poate de ilustrativ pentru fluiditatea concepțiilor dezvoltate în oncologia moleculară. La sfârșitul anilor '70, P53 a fost considerată ca fiind un antigen tumoral față de care organismul gazdă răspunde prin elaborarea de anticorpi specifici; esențială pentru inducerea răspunsului a apărut a fi asocierea cu o proteină virală, și anume antigenul mare T al SV40. Ulterior s-a constatat că gene p53 are capacitatea de a coopera cu oncogena ras în transformarea *in vitro* a celulelor normale. Ca atare, la sfârșitul deceniului 8, genei p53 i s-a atribuit funcția de oncogenă. Reluarea experimentelor de transfecție a furnizat o surpriză de proporții: gena amplificată prin clonare și transfectată în celulele normale s-a dovedit a fi fost, de fapt, o formă mutantă a p53.

Cercetările ultimilor ani au adus argumentele decisive în sprijinul concepției potrivit căreia p53 este o genă supresoare a creșterii tumorale, (tabelul 2.19), relevând totodată că, prin comportamentul ei special, p53 încalcă o serie de „reguli" ale oncologiei moleculare. Câteva dintre „ereziile" oncogenezei prin p53 sunt prezentate în tabelul 2.20.

Tabelul 2.19

Argumente experimentale care confirmă natura de genă supresoare a creșterii tumorale a p53

1. Gena p53 normală este capabilă să producă, *in vitro*, reversia fenotipului malign al celulelor umane din cancerele colonice și din osteosarcoame
2. Mutațiile și delețiile alelice ale p53 sunt asociate unui spectru foarte larg de tumori din diferite organe și țesuturi (colon, esofag, ficat, plămân, sân, vezică urinară, ovar, sistem nervos și țesut hematopoietic)
3. Predispoziția la sindromul cancerelor familiale Li-Fraumeni se datorează mutațiilor în celulele liniei germinale ale genei p53
4. Animalele transgenice deficiente pentru ambele alele p53 sau cele care posedă o singură alelă mutantă sunt semnificativ mai susceptibile la dezvoltarea spontană a unor neoplazii variate
5. Numeroase oncoproteine inactivează funcțional, prin legare sau degradare, proteina normală p53

Tabelul 2.20

„Ereziile" genei p53

1. Cea mai frecvent alterată genă în patologia umană; peste jumătate din bolnavii cu neoplazii prezintă modificări ale genei p53
2. Genă cu expresie ambivalentă: capacitate de supresie a creșterii tumorale și capacitate oncogenică
3. În celulele normale și în condiții normale de mediu gena p53 nu are roluri biologice decelabile
4. Spre deosebire de alte antioncogene, care sunt inactivate prin mutații de tipul „pierdere de funcție", p53 prezintă și mutații „câștig de funcție" (care îi conferă potențial oncogen)
5. Peste 80% din mutații sunt cu sens greșit; acest tip de mutații este rar întâlnit în alte gene supresoare
6. Majoritatea mutațiilor punctiforme dintr-un anumit tip de cancer (hepatom) sunt localizate într-un unic codon(249)
7. În majoritatea cancerelor, alterarea p53 este un indicator independent de prognostic negativ

2.2.14.2. Descriere succintă a genei p53 și a proteinei P53

Celulele umane normale posedă câte două copii ale genei p53, al cărei locus se află pe brațul scurt al cromozomului 17, în poziția 17p13. Gena, cu o lungime de aproximativ 20 de kilobaze, este alcătuită din 11 exoni, dintre care primul este necodificant. În secvența nucleotidică a genei există cinci regiuni înalt conservate în evoluția vertebratelor, situate în exonii 1, 4, 5, 7 și 8.

Proteina codificată este formată din 393 de aminoacizi, are o greutate moleculară de 53 kDaltoni și o durată de viață foarte scurtă (timpul de înjumătățire — 15 minute); este localizată intranuclear și există sub două forme: nefosforilată și fosforilată. Fosforilarea se realizează în situsuri speciale sub acțiunea unei kinaze (kinaza dependentă de ciclul celular — CDC2, caseinkinaza II—CKII sau proteinkinaza C-PKC). Diferitele regiuni structurale ale P53 prezintă un polimorfism funcțional remarcabil: regiunea carboxiterminală are rol în formarea oligomerilor funcționali, regiunea centrală conține semnalele necesare localizării nucleare și legării la ADN, iar cea aminoterminală — domeniul de transactivare (reglare a expresiei genelor localizate pe alți cromozomi). Numeroase alte situsuri de legare pentru proteine celulare (Mdm2, WT1, Rb) sau virale (E1B, EG, antigenul mare T) sunt dispersate în diferite zone ale proteinei P53 (figura 2.23).

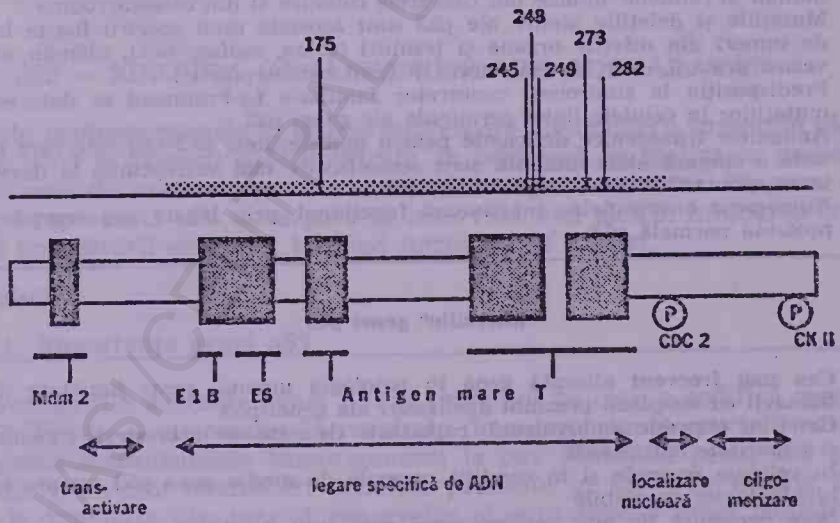


Fig. 2.23. Structura proteinei P53 și localizările cele mai frecvente ale mutațiilor genei p53.
Dreptunghiurile pline reprezintă cele 5 domenii înalt conservate în evoluție: situsurile de fosforilare, regiunile de legare a proteinelor virale sau celulare și domeniile funcționale, corespunzând aminoacizilor 13—19, 117—142, 171—181, 234—258 și, respectiv, 270—286. Mutațiile genei p53 sunt localizate preponderent la nivelul anumitor codoni (indicați prin numere). De precizat, totuși, că au fost identificate mutații în toate regiunile genei (dreptunghiurile negre).

2.2.14.3. Rolurile p53 în celula normală

Spre deosebire de toate celelalte gene cunoscute a interveni în tumorigeneză, p53 pare a nu fi esențială pentru viața celulei normale în condiții obișnuite de mediu (extra- și intracelular). Nivelul exprimării genei p53, apreciat prin cantitatea de P53 prezentă în celule, este foarte redus, ceea ce face neplauzibilă exercitarea de către P53 a unor funcții biologice semnificative. În plus, șoarecii transgenici având ambele copii ale genei p53 inactivate nu prezintă anomalii și ajung la maturitate, fapt care atestă că p53 nu este indispensabilă dezvoltării normale embrionare, fetale și postnatale. Aceste observații sunt, cel puțin aparent, în contradicție cu datele privitoare la funcțiile biochimice ale proteinei P53 (figura 2.24), dintre care două, teoretic, par a fi esențiale pentru supraviețuirea celulei:

a) *Funcția de factor de transcriere*, care este argumentată — pe de o parte de prezența în molecula P53 a unui domeniu de legare la ADN și — pe de altă parte, de existența în genom a numeroase situsuri specifice de legare a P53. În ce privește funcția de factor de transcriere, s-a stabilit că P53 stimulează transcrierea genelor care, la nivelul promotorului, conțin un situs pentru legarea P53: mdm 2 („murine double minute" — o oncogenă amplificată în numeroase sarcoame), gena creatinkinazei musculare sau gena GADD45 („growth arrest DNA damage inducible") — care determină sinteza unei proteine cu rol de a opri progresiunea prin ciclul celular în situația lezării ADN —, genele waf1 sau cele ale Ig. În schimb, P53 s-a dovedit a fi un inhibitor transcripțional al genelor care la nivelul promotorului prezintă elementul de control TATA, precum și al genelor c-fos, c-jun și Rb;

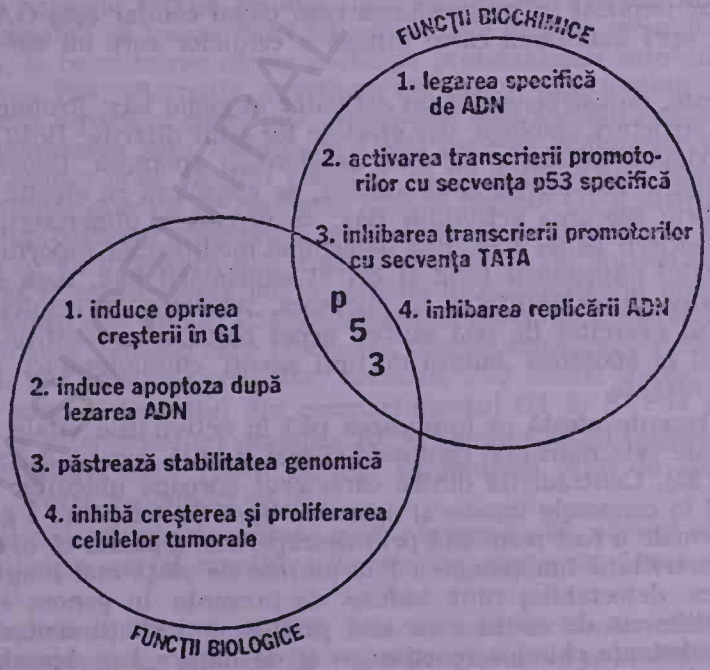

FUNCȚII BIOCHIMICE
1. legarea specifică de ADN
2. activarea transcrierii promotorilor cu secvența p53 specifică
3. inhibarea transcrierii promotorilor cu secvența TATA
4. inhibarea replicării ADN
p 5 3
1. induce oprirea creșterii în G1
2. induce apoptoza după lezarea ADN
3. păstrează stabilitatea genomică
4. inhibă creșterea și proliferarea celulelor tumorale
FUNCȚII BIOLOGICE

Fig. 2.24. Funcțiile biochimice și biologice ale genei p53.

b) Funcția de inhibitor al replicării ADN, exercitată prin interferarea cu proteine cheie necesare biozintezei ADN. Una dintre acestea este proteina RPA („replication protein A"), a cărei atașare la ADN monocatenar se realizează într-una dintre etapele inițiale ale procesului replicativ; consecința interacțiunii cu P53 este inhibarea intrării în faza S și, posibil, direcționarea celulei către apoptoză.

Implicarea minimală a p53 în fiziologia celulei normale este în contradicție, de asemenea, și cu amplul ansamblu de interconexiuni funcționale ale proteinei P53 cu alte molecule proteice intracelulare. P53 apare a fi componentul nuclear al unei căi de semnalizare (sau a mai multora?) care, în celulele normale aflate în condiții obișnuite de mediu, este comutată pe poziția „închis". În amonte de P53 sunt situate o serie de protein-kinaze (Cdc2, Ck11, Pkc) a căror activitate determină fosforilarea unor reziduuri specifice. Fosforilarea conduce la activarea P53, cu formarea consecutivă de tetrameri funcționali a căror durată de viață este mult mai lungă (câteva ore). Tetramerii exercită diferite activități biologice, fie direct, fie prin intermediul unor efectori situați în aval. Unul dintre aceștia este produsul genei waf1, a cărei transcriere este stimulată de P53. Proteina WAF1 (cunoscută sub denumirile de Pic1, Cip1 sau p21) este un inhibitor potent al unor kinaze care funcționează în momentul tranziției G1→S.

Progresiunea prin ciclul celular se află sub controlul unei familii de proteine denumite cicline. Activarea acestora este realizată prin fosforilare de către o serie de kinaze specifice (kinaze dependente de cicline, CDK) controlate de proteine cu funcții inhibitoare, printre care WAF1, cu rol în blocarea activității kinazei CDK2, necesară parcurgerii fazei G1. Secvența waf1 este principala genă efectoare activată de P53. Deleția genei p53 determină reducerea la zero a nivelului intracelular al WAF1. Un alt efector implicat în progresiunea prin ciclul celular este GADD45, cunoscut a opri înaintarea către mitoză a celulelor care au suferit leziuni ale ADN.

P53 este, de asemenea, și un activator al genei bax. Proteinele Bax și Bc12 au structuri omologe, dar efectele lor sunt diferite: Bc12 crește durata de viață a celulelor iar Bax accelerează apoptoza. Deoarece aceste două proteine pot forma heterodimeri, se consideră că efectul Bc12 este realizat prin blocarea activității Bax, ca urmare a dimerizării. Crescând rata transcrierii genei Bax, p53 determină modificarea raportului normal între nivelul exprimării bc12 și cel al exprimării bax, ceea ce mărește semnificativ susceptibilitatea la apoptoză. Abolirea, în celulele maligne, a efectului exercitat de p53 asupra genei bax poate constitui explicația rezistenței la apoptoză indusă de unii agenți chimioterapici sau de radiațiile ionizante.

Date recente atestă că implicarea p53 în activitățile vitale ale celulelor normale este mult mai profundă și mai subtilă decât s-a crezut inițial (figura 2.25). Contradicția dintre caracterul aproape ubicuitar al anomaliilor p53 în cancerele umane și aparenta lipsă de activitate a genei în celulele normale a fost rezolvată prin descoperirea faptului că nivelele crescute ale activității funcționale a P53 (durata de viață mai lungă și funcții biochimice detectabile) sunt induse de prezența în genom a leziunilor ADN, indiferent de cauza care le-a produs — radiații ionizante, ultraviolete, substanțe chimice reactive — și de natura lor. Această descoperire a condus la ipoteza că proteina normală P53 face parte dintr-o cale

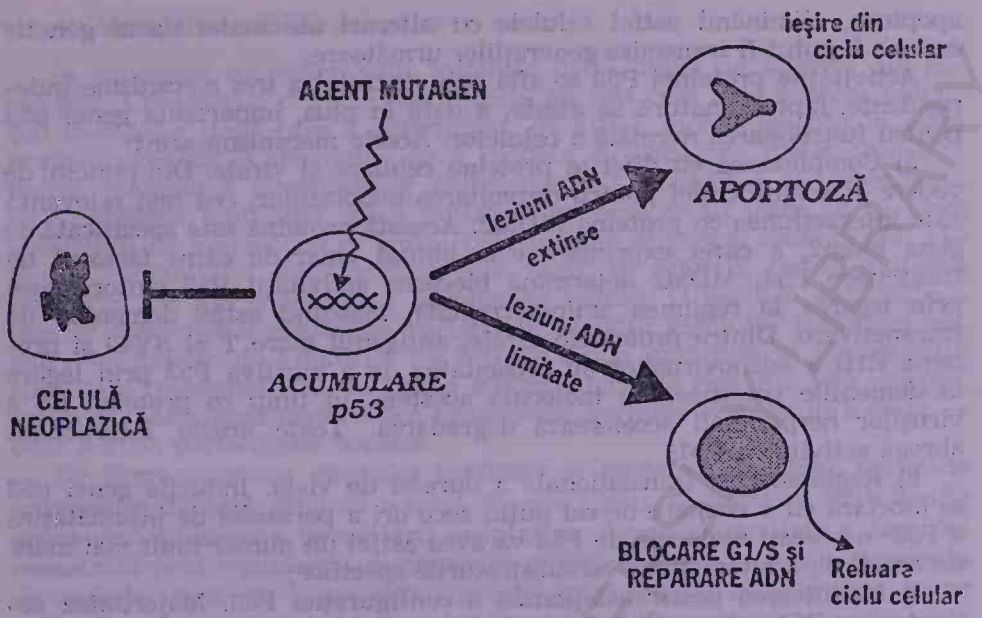


Fig. 2.25. Funcţiile p53 în celula normală.
Săgeţile pline — stimulare; bară — inhibiţie.

de semnalizare care controlează integritatea structurală a genomului. Ipoteza a fost confirmată de o multitudine de date experimentale care au permis construirea unui model explicativ al activităţii p53 (vezi figura 2.25).

Celulele normale supuse acţiunii unor factori de stres din mediul extracelular capabili să lezeze ADN îşi activează o cale de semnalizare (sau mai multe), la constituirea căreia participă proteinkinaze care au ca substrat proteina P53; alternativ, printr-un mecanism încă ipotetic, este posibilă inducţia directă a genei p53. Rezultatul este acelaşi: creşterea cantităţii şi stabilizarea prin fosforilare a P53 care va acţiona un timp mai îndelungat asupra unor efectori specifici, ca de pildă WAF1. Efectorii activaţi vor obtura punctul de restricţie aflat la hotarul G1-S, mărind intervalul de timp destinat intervenţiei mecanismelor de reparare a leziunilor ADN, ceea ce va împiedica atât fixarea sub formă de mutaţii a defectelor ADN cât şi transmiterea lor la celulele fiice. Substratul molecular al acestei activităţi este dublu: P53 acţionează ca factor de transcriere stimulând exprimarea genelor care blochează progresiunea prin ciclul celular şi, implicit, multiplicarea celulelor; totodată, P53 inhibă transcrierea genelor care asigură tranzitul din compartimentul G1 în S. P53 poate, de asemenea, să interfereze cu proteina RPA, blocând astfel iniţierea procesului de replicare ADN. Acest context evidenţiază rolul de „paznic" al genomului celular, îndeplinit de p53.

În celulele deprivate de ambele cópii ale genei p53, nivelul evenimentelor mutaţionale sau al amplificărilor genice creşte cu câteva ordine de mărime.

După repararea leziunilor ADN, într-un mod încă neprecizat, nivelul P53 revine normal, iar celulele îşi reiau progresiunea prin ciclul celular. În situaţia în care leziunile ADN nu au fost reparate, p53 determină

apoptoza, eliminând astfel celulele cu alterări ale materialului genetic care ar fi putut fi transmise generațiilor următoare.

Activitățile proteinei P53 se află sub controlul a trei mecanisme independente, fapt de natură să ateste, o dată în plus, importanța genei p53 pentru funcționarea normală a celulelor. Aceste mecanisme sunt:

a) Complexarea cu diferite proteine celulare și virale. Din punctul de vedere al semnificației pentru dezvoltarea neoplaziilor, cea mai relevantă este interacțiunea cu proteina MDM2. Această proteină este specificată de gena mdm2, a cărei exprimare este indusă chiar de către factorul de transcriere P53; MDM2 determină blocarea activității P53 (autoreglare) prin legarea la regiunea aminoterminală, mascând astfel domeniul de transactivare. Dintre proteinele virale, antigenul mare T al SV40 și proteina E1B a adenovirușilor au capacitatea de a inactiva P53 prin legare la domeniile specifice din molecula acesteia, în timp ce proteina E6 a virușilor herpetici îi accelerează degradarea. Toate aceste interacțiuni abrogă activitatea P53;

b) Reglarea post-translațională a duratei de viață. Inducția genei p53 se asociază cu o creștere de cel puțin zece ori a perioadei de înjumătățire a P53: o aceeași moleculă de P53 va avea astfel un număr mult mai mare de ocazii de a interacționa cu substraturile specifice;

c) Modificarea posttranslațională a configurației P53. Majoritatea activatorilor P53 acționează prin fosforilarea regiunii C-terminale, iar alterarea consecutivă a structurii spațiale a P53 are ca rezultat formarea oligomerilor funcționali.

O funcție esențială a proteinei normale P53 este aceea de a inhiba creșterea și proliferarea celulelor tumorale. Datele care demonstrează natura de genă supresoare a genezei tumorale a p53 — extrem de numeroase și variate — au fost obținute prin investigații întreprinse pe modele experimentale *in vitro* și *in vivo*, inclusiv pe animale transgenice (vezi tabelul 2.19).

În celulele neoplazice, alterarea genei p53 este urmată de exprimarea inadecvată a genelor efectoare care, nemaiblocând complexele moleculare frenatoare ale progresiunii prin ciclul celular, fac posibilă proliferarea celulară neprogramată.

Totuși, cancerul nu este numai o consecință a perturbării ciclului celular, iar proliferarea neprogramată nu este echivalentă cu malignizarea. De aceea este de presupus că reversarea fenotipului malign sau blocarea de către p53 a dezvoltării tumorilor reprezintă rezultatele unor activități — încă neidentificate — realizate independent de acțiunea inhibitoare asupra ciclului celular.

2.2.14.4. Alterările p53 în neoplaziile umane

Alterările genei p53, prezente în 50—65% din cancerele umane, se situează pe primul loc în ierarhia implicării modificărilor genetice în etiopatogenia neoplaziilor maligne, la mare distanță de ocupanta locului 2 — oncogena ras —, a cărei frecvență în tumorile umane nu depășește 10—15%.

Gena p53 arborează un spectru larg de modificări mutaționale care pot fi prezente atât în celulele somatice, cât și în celulele liniei germinale.

A. Mutații în celulele somatice

În cancerele sporadice sunt întâlnite două tipuri de alterări ale genei p53. Cronologic, primele identificate au fost cele care conferă potențial oncogenic, fapt care a determinat, de altfel, includerea p53 în clasa protooncogenelor. Capacitatea de a coopera cu oncogena ras în transformarea malignă a fibroblaștilor embrionari s-a dovedit a fi dependentă de localizarea mutațiilor: dacă mutațiile cu sens greșit (care au ca efect substituții de aminoacizi în lanțul polipeptidic) afectează codonii 143, 175 și 275, potențialul transformant este înalt; în schimb, forma mutantă P53 Hys 273 are o activitate oncogenică redusă. O posibilă explicație a acestor diferențe o constituie variația intensității efectului dominant negativ în funcție de alterările pe care le induc mutațiile în configurația spațială a moleculei P53. În prima situație, formele mutante P53 complexează și inactivează majoritatea proteinelor normale P53, iar în a doua — doar o mică parte dintre acestea.

Pe lângă anularea efectului inhibitor al proteinei normale, mutațiile oncogenice dotează gena cu o nouă funcție („gain of function mutation"): aceea de stimulare a dezvoltării neoplazice. Această activitate a fost demonstrată prin transfecția de mutante oncogenice p53 în celule deprivate de ambele còpii ale genei p53 normale. Implantarea la animale a unor astfel de celule determină invariabil formarea de tumori.

O a doua categorie de mutații ale genei p53 — mult mai frecvente — le include pe cele care se însoțesc de pierderea capacității de supresie a formării și dezvoltării tumorilor („loss of function mutation"). Substratul molecular al acestor alterări este reprezentat de deleții de dimensiuni variate la nivelul 17p13, rearanjări structurale, inserții și, mai ales, mutații punctiforme. Ultimele prezintă anumite particularități, dintre care cele mai importante sunt următoarele:

a) În marea lor majoritate (peste 90%), sunt localizate în regiunea centrală a genei, între codonii 110 și 307, într-o zonă care corespunde exonilor 5—8. Acești exoni codifică aminoacizii a patru din cele cinci domenii înalt conservate ale P53 (reziduurile 117—142, 174—181, 234—258 și 270—280). Șase codoni (din cei 393) sunt implicați în peste un sfert din aceste mutații (codonii 175, 245, 248, 249, 273 și 282), 13% dintre ele fiind localizate numai în codonul 273 (vezi figura 2.23).

Dacă se are în vedere numărul foarte mare de neoplazii caracterizate prin alterări ale p53, această distribuție neîntâmplătoare apare a fi cu totul remarcabilă. Pe de altă parte, 10% din mutații interesează alte regiuni ale genei, ceea ce relevă că nici unul dintre domeniile P53 nu este, în exclusivitate, răspunzător de realizarea funcției supresoare.

Spre deosebire de alte GSCT, ca de pildă Rb și APC, a căror inactivare este consecința unor mutații fără sens („non sense") care produc trunchierea proteinei codificate, peste 90% din mutațiile genei p53 sunt mutații cu sens greșit. Modificările secvenței aminoacidice a P53 îi alterează configurația spațială și îi cresc stabilitatea, perturbând, totodată, activitățile specifice ale diferitelor domenii funcționale.

b) Cele mai multe dintre mutațiile punctiforme ale genei p53 întâlnite în celulele neoplazice sunt spontane. Producerea lor este independentă de intervenția agenților mutageni din mediul extern. În apariția

mutațiilor spontane sunt incriminate: infidelități ale copierii ADN, depurinarea, leziunile ADN datorate acțiunii unor agenți oxidanți rezultați în cursul diferitelor procese metabolice (radicali liberi, monoxidul de azot), dezaminarea 5 metil-citozinei. În legătură cu aceasta din urmă trebuie menționat că rata înaltă a mutațiilor în insulele CpG se datorează prezenței la acest nivel a citozinei metilate, a cărei dezaminare are drept consecință tranziția C → T.

Acțiunea agenților exogeni este de importanță secundară în ce privește geneza mutațiilor punctiforme din cancere. Natura agentului mutagen este determinantă pentru tipul de leziune: expunerea la radiații ultraviolete este urmată de formarea dimerilor de timină, iar carcinogenii chimici ambientali (aflatoxine alimentare, fumul de țigară) produc transversii AT → CG.

Analiza alterărilor p53 identificate în diferite tipuri de tumori este în măsură să orienteze asupra cauzelor care le-au produs:

— la bolnavii cu cancer de colon, 80% din mutații sunt tranziții G—C → A—T, localizate la nivelul insulelor CpG, și peste jumătate dintre ele afectează codonii 175, 248 și 273. Aceste observații sunt sugestive pentru mutageneza prin dezaminare endogenă. Rezultă că spectrul mutațional al p53 în cancerul colorectal se realizează fără intervenția carcinogenilor exogeni;

— în cazul carcinomului hepatocelular (CHC) se descriu două situații diferite. În zonele geografice cu risc înalt (Mozambic, regiunea Quidong din China), în care prevalența CHC depășește cu mult 40 de cazuri la suta de mii de locuitori, infecția cronică cu virusul hepatitei B și ingestia de alimente contaminate cu aflatoxina B1 reprezintă factori de risc sinergici. În 91% din cazuri, mutațiile p53 sunt transversii G→T localizate într-un același situs — codonul 249. O astfel de uniformitate nu a mai fost întâlnită în nici un alt tip de cancer, și este revelatoare pentru acțiunea predilectivă a toxinelor produse de unele specii de *Aspergillus*. În țările Europei și Americii de Nord prevalența CHC este redusă (sub 40 cazuri/100 000 locuitori) iar spectrul mutațional al p53 apare a fi similar cu cel observat în neoplaziile în care rolul de generator al mutațiilor revine factorilor endogeni. Valori medii ale prevalenței se înregistrează în Asia de Sud-Est (Japonia, Taiwan); tumorile bolnavilor din aceste zone conțin mutații ale p53 rezultate atât prin transversii G → T, cât și prin tranziții G → A. Concluzia care se desprinde este aceea că bazele genetice ale carcinogenezei hepatice diferă în funcție de distribuția geografică a factorilor mutageni;

— în cancerele pulmonare cu celule mici și în cele esofagiene — ambele asociate cu fumatul — au fost identificate numeroase transversii GC → TA, dispersate pe întreaga lungime a genei p53; producerea lor se corelează cu acțiunea benzopirenului din fumul de țigară.

În unele tipuri de neoplazii maligne, deși gena p53 este intactă, funcțiile ei sunt aparent abolite datorită inactivării P53 prin complexarea cu unele proteine celulare și virale. Astfel, în cancerul de col uterin proteina E6 a virusului herpetic reduce activitatea de factor de transcriere a tetramerului P53. La același rezultat conduce și creșterea nivelului oncoproteinei MDM2 consecutivă amplificării genei mdm2, frecventă în multe dintre sarcoamele umane.

B. *Modificările genei p53 în celulele liniei germinale*

Aproximativ 5% din bolnavii cu sindroame de cancere familiale sunt purtători ai unor mutații la nivelul genei p53, moștenite de la unul din părinți. Dintre aceste afecțiuni, cel mai bine caracterizat din punct de vedere genetic este sindromul Li-Fraumeni (SLF). Spre deosebire de mutațiile apărute în celulele somatice, cele întâlnite la bolnavii cu SLF nu sunt localizate preferențial, ci pot interesa oricare din regiunile genei (inclusiv intronii). Mutațiile p53 transmise ereditar se dovedesc a fi inițiatori tumorali slabi: doar 50% dintre purtătorii mutației dezvoltă până la vârsta de 30 de ani una dintre formele de cancere asociate acestui sindrom (neoplasme mamare, osteosarcoame, tumori cerebrale, leucemii, cardcinoame adrenocorticale), iar numărul mediu de tumori per individ este mai mic de 2. Această particularitate s-ar putea datora efectului dominant negativ și/sau stabilității mai reduse manifestate de formele mutante ale proteinei P53.

O altă particularitate a tumorigenezei prin p53 este relevată de următoarele observații: mutațiile p53 moștenite reprezintă evenimentele inițiatoare ale malignizării la majoritatea bolnavilor cu SLF și se produc cu 10—30 de ani anterior debutului clinic al tumorilor; în schimb, în cancerele sporadice alterările genei p53 sunt evenimente tardive, produse cu 10—30 de ani după inițierea procesului malign. Rezultă, o dată în plus, că în dezvoltarea unei tumori important nu este atât momentul producerii unei anumite mutații cât, mai ales, acumularea unui număr critic de modificări genetice.

2.2.14.5. Un model posibil al tumorigenezei prin p53

Din cele menționate mai sus rezultă că gena p53 acționează atât la nivel celular, cât și la nivelul întregului organism. În celulele normale, intrarea în activitate a genei p53 se produce în condiții de stres, când este periclitată menținerea integrității materialului genetic. Întârziind înaintarea celulelor către faza S, p53 favorizează repararea leziunilor ADN, iar dacă acestea rămân nereparate, direcționează celula spre apoptoză. La nivelul organismului, p53, deși nu participă efectiv la realizarea proceselor de creștere și dezvoltare, îndeplinește importanta funcție de a inhiba formarea tumorilor.

Celulele tumorilor *in situ* traversează o perioadă de stres determinată de aneuploidizare — rezultat al instabilității genomice — și de hipoxia inerentă deficitului de vascularizare creat de expansiunea populației neoplazice. În aceste condiții gena p53 se activează transcripțional și limitează creșterea celulară fie prin stimularea genelor care stopează progresiunea prin ciclul reproductiv, fie prin inhibarea genelor care stimulează diviziunea mitotică. Acesta este momentul în care, prin activitatea sa, p53 se constituie în limitantă a ratei de creștere a tumorilor. Mecanismele selecției operează, însă, reținând celulele care conțin mutații ale genei p53; devine, în acest mod, posibilă dezvoltarea în continuare a tumorilor. Se explică astfel de ce pierderile alelice ale p53 sunt, în general, evenimente târzii, produse după ce presiunea exercitată de condițiile de stres a selectat celulele purtătoare de mutații. Inițial, alterarea interesează o singură copie a genei: proteina mutantă P53, prin efect dominant negativ,

va masca prezența în celulă a alelei normale; chiar și simpla reducere la jumătate a cantității de P53 normală poate fi suficientă pentru abolirea efectelor biologice. Ulterior, ca urmare a inactivării celei de a doua còpii a genei p53, celula se va sustrage complet de sub acțiunea controlului exercitat prin proteina P53. O astfel de celulă va fi dotată cu avantaj selectiv deoarece:

a) leziunile ADN nereparate înainte de debutul fazei S vor accentua instabilitatea genomică;

b) durata de viață va crește ca urmare a dezorganizării căii de inducere a apoptozei controlate de p53;

c) dispariția funcției intrinseci de inhibare a creșterii tumorale îi va permite proliferarea nelimitată. Acționând concertat, aceste efecte ale inactivării p53 vor accelera dezvoltarea tumorii și vor conduce la dobândirea potențialului metastazant (figurile 2.26 și 2.27).

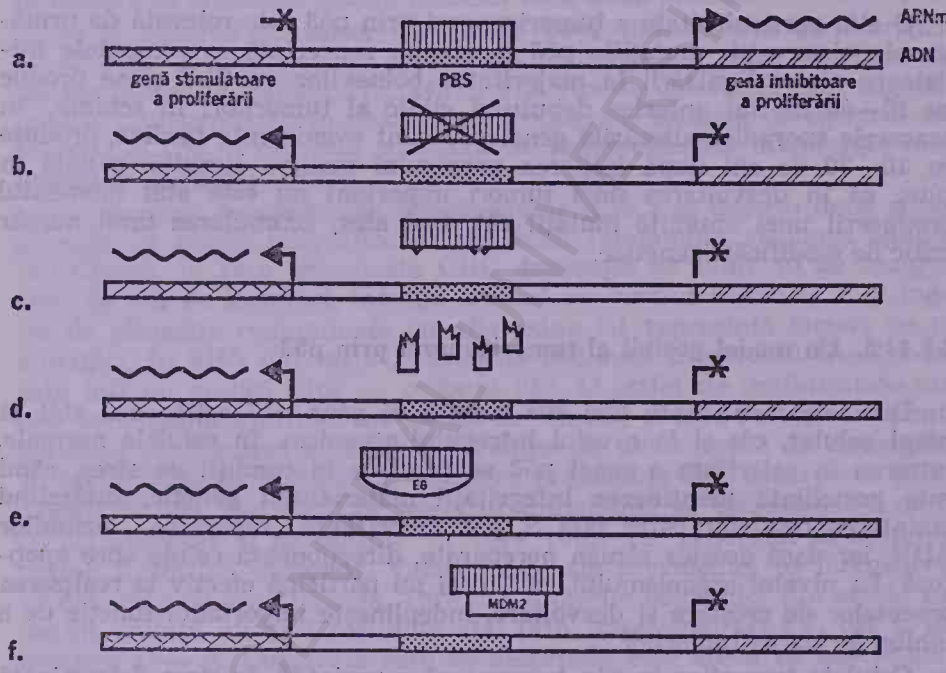


Fig. 2.26. Mecanismele inactivării p53.

(a) în celula normală tetramerii P53 se leagă la un situs specific (PBS) activând genele inhibitoare ale creșterii și inhibându-le pe cele activatoare; (b) în numeroase tumori se produce deleția uneia/ambelor alele p53, ceea ce conduce la diminuarea/dispariția P53; (c) cel mai frecvent mecanism este cel reprezentat de mutațiile cu sens greșit care, prin modificarea secvenței de aminoacizi, determină schimbarea configurației spațiale a P53; acest mecanism funcționează în neoplasmele colonice, pulmonare, mamare, tegumentare, vezicale, hepatice, gastrice, neurogene, precum și în hemopatiile maligne; (d) în cancerele pulmonare și esofagiene se produc uneori mutații nonsens care determină sinteza unei P53 trunchiate, incapabilă să se lege la PBS; (e) în cancerul de col uterin proteina E6 a virusului herpetic complexează tetamerii P53, inactivându-i; (f) în numeroase sarcoame amplificarea genei mdm2 conduce la sinteza în exces a proteinei MDM2 care formează complexe nefuncționale cu P53. În situațiile b—f rezultatul este același: genele inhibitoare ale creșterii și proliferării își încetează activitatea, iar cele activatoare sunt exprimate fenotipic.

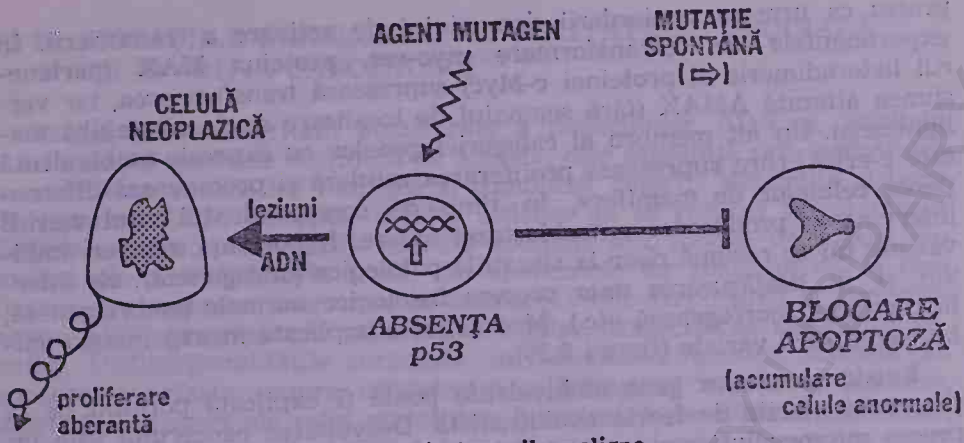


Fig. 2.27. Consecințele inactivării p53 în tumorile maligne.

O consecință de ordin practic a prezenței în celulele tumorale a mutațiilor p53 este aceea că, datorită abolirii apoptozei indusă de substanțe chimice și de radiații ionizante, cancerele care conțin aceste mutații se caracterizează printr-un răspuns slab la tratament.

2.2.15. O SERIE DE GENE FUNCȚIONEAZĂ ATÂT CA ONCOGENE, CÂT ȘI CA GENE SUPRESOARE ALE CREȘTERII TUMORALE

Unele gene normale care intervin în controlul creșterii, proliferării și diferențierii celulare pot manifesta, în condiții temporospațiale bine definite, fie capacitate oncogenică, fie capacitate supresoare.

Exemplele de gene cu expresie ambivalentă sunt din ce în ce mai numeroase (tabelul 2.21). De remarcat că proteinele codificate de aceste

Tabelul 2.21

Exemple de gene cu expresie ambivalentă

Localizare proteină	Genă
Membrană	c-abl, ret, c-H-ras
Citoplasmă	PKC
Nucleu	p53, c-erbA, max*, fosB**

* max codifică o proteină care complexează și facilitează funcția de factor de transcriere a Myc

** fosB este un membru al familiei fos

gene sunt componente esențiale ale căilor de semnalizare intracelulară, în cadrul cărora funcționează atât ca activatori, cât și ca inhibitori ai proliferării celulare.

În mod normal, gena c-abl reglează negativ creșterea celulară, în timp ce produsul genei hibridice bcr/abl este implicat în etiopatogenia leucemiilor acute și a leucemiei mieloide cronice Ph pozitive. Șirul exemplelor poate continua cu fosB, o oncogenă care induce transformarea liniei celulare IA de șoarece; în schimb, versiunea trunchiată ΔfosB inhibă acest

proces ca urmare a pierderii domeniului de activare a transcrierii. În experimentele de cotransformare myc-ras, proteina MAX (partenerul heterodimeric al proteinei c-Myc) supresează transformarea, iar versiunea alterată ΔMAX (fără semnalul de localizare nucleară) inhibă malignizarea. Un alt membru al categoriei genelor cu expresie ambivalentă este c-erbA, care supresează proliferarea celulară și promovează diferențierea celulelor de mamifere, în timp ce corespondentul viral v-erbB intervine în producerea eritroblastozei aviare. Importanța genelor ambivalente nu se rezumă doar la situațiile patologice (oncogeneză); ele intervin și în desfășurarea unor procese fiziologice normale (embriogeneză, histogeneză, morfogeneză etc.). Mecanismele implicate în exprimarea ambivalentă sunt variate (figura 2.28).

Existența acestor gene ambivalente poate fi explicată pornind de la premisele oferite de teoria evoluționistă. Dezvoltarea cancerului este un proces microevoluționar realizat după principiile variabilității și selecției naturale care guvernează evoluția pe termen lung a tuturor speciilor animale și vegetale. Variabilitatea evidențiată *in vitro* la nivelul unui situs genic nu reprezintă decât o parte infimă a celei care se produce *in vivo*, în numeroasele populații celulare din care este alcătuit organismul uman. Unele modificări genice sunt detrimentale (intervin în dezvoltarea fenotipului malign), altele sunt avantajoase (supresează inițierea și/sau progresiunea tumorilor), dar majoritatea sunt neutre (fără efecte asupra funcției proteinei normale).

Celulelor neoplazice le este propriu gradul înalt de instabilitate genomică. Ca atare, în comparație cu celulele normale, cele neoplazice au o probabilitate cu mult mai mare de a achiziționa și acumula mutații (celulele anumitor carcinoame colorectale pot prezenta în genomul lor zeci de mii de mutații). Dintre acestea, unele — deși detrimentale pentru organismul purtător căruia îi vor produce în final moartea — sunt cert avantajoase pentru celulele care le conțin deoarece le conferă imortalitate, agresivitate sporită și capacitatea de a invada și coloniza alte teritorii.

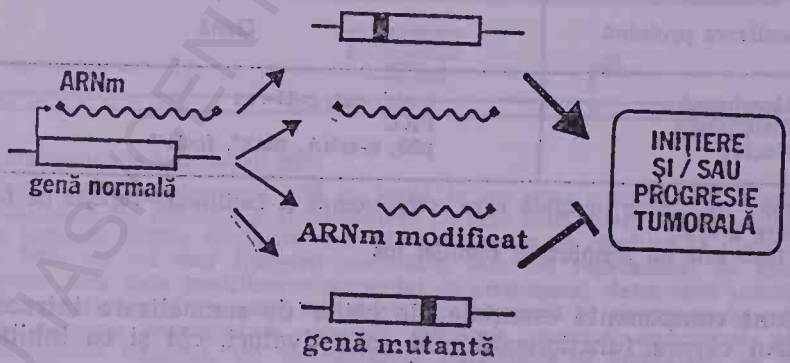


Fig. 2.28. Genele cu expresie ambivalentă pot bloca sau stimula tumorigeneza în funcție de modificările structurale sau funcționale suferite (mutații punctiforme, procesări posttranscripționale ale ARNm).
Zona înnegrită — alterare; săgeata groasă — stimulare; bară — inhibare.

2.2 16. MUTAȚIILE GENELOR DE STABILITATE SE ASOCIAZĂ CU APARIȚIA CANCERULUI

Prezervarea integrității structurale a moleculelor ADN și, implicit, a informației genetice conținută de acestea, este asigurată prin activitatea unor sisteme enzimatice multiple și complexe, colectiv denumite sisteme de reparare ADN. Funcțiile acestor sisteme nu se rezumă la corectarea defectelor structurale ADN apărute spontan sau induse de agenți din mediu; ele participă, prin unele din elementele lor constitutive, la realizarea sau reglarea unor procese celulare vitale (replicarea și recombinarea ADN, progresiunea prin ciclul celular, transcrierea mesajului genetic). Disfuncționalitățile survenite în activitatea acestor sisteme au consecințe nefaste asupra celulelor și a întregului organism deoarece, antrenând creșteri ale ratei mutațiilor, favorizează dezvoltarea tumorilor, accelerează procesele de îmbătrânire, reduc considerabil durata de viață.

Unuia dintre aceste sisteme îi revine rolul de a supraveghea desfășurarea replicării ADN în vederea asigurării gradului maxim de fidelitate în copierea informației. Replicarea ADN este un proces susceptibil de erori. S-a calculat că fiecare rundă de replicare este grevată de riscul producerii a 10^{-10} greșeli de copiere per pereche de baze azotate. Un astfel de risc ar putea să pară nesemnificativ. În realitate, cantitatea globală de erori introduse de biosinteza replicativă a ADN este departe de a fi neglijabilă deoarece: organismul uman este alcătuit din 10^{14} celule; genomul celular conține 3×10^9 perechi de baze; pe parcursul celor 70 de ani, cât reprezintă durata medie de viață, celulele realizează 10^{16} runde de replicare ADN. Se acumulează astfel în genom mutații spontane într-un număr care îl depășește de câteva ori pe cel al mutațiilor induse de factorii ambientali. Este deci firesc să se considere că erorile biochimice inerente procesului biosintezei ADN răspund de o proporție importantă a cazurilor de cancer la om sau, altfel spus, o fracție semnificativă a cancerelor se dezvoltă spontan, în absența oricărei expuneri la carcinogeni din mediul extern.

Funcționarea defectuoasă a sistemului de corectare a erorilor generate de replicarea ADN creează instabilitate genomică; după cum se va vedea în cele ce urmează, această instabilitate reprezintă cauza directă a dezvoltării unor tipuri de tumori umane. Expunerea datelor referitoare la aspectele și consecințele instabilității genomice se cere însă a fi precedată de o scurtă prezentare a sistemului de corectare a erorilor.

Acest sistem, denumit „al reparării împerecherilor greșite" („mismatch repair system", MRS) a fost identificat și complet caracterizat încă de acum 20 de ani prin studierea unor tulpini hipermutabile de *Escherichia coli*. Investigații ulterioare au relevat înalta similaritate structurală și funcțională a MRS descris la bacterii cu sistemele omoloage din celulele umane.

Cercetările întreprinse la bacterii au stabilit că:

— Substratul activității MRS îl constituie:

a) împerecherile de baze care contravin regulei complementarității (potrivit căreia bazele purinice de pe o catenă — adenina (A) și guanina (G) — se pot împerechea numai cu pirimidinele timina (T) și, respectiv, citozina (C) de pe catena apusă, și invers); o eroare de împerechere rezultă, de pildă, prin introducerea unei timine în complementaritate cu guanina;

b) nucleotidele inserate adiţional în catena nou formată şi care, neavând corespondent în catena matriţă, vor forma a buclă extrahelicală;

— Semnalele care amorsează acţiunea MRS sunt, obligatoriu, unele indirecte deoarece bazele eronat împerecheate, fiind structural normale, nu au cum să fie recunoscute de senzorii sistemului. S-a stabilit că semnalele provin din însăşi catena nouă şi sunt reprezentate de starea de metilare a adeninei din secvenţele GATC. Pentru o scurtă perioadă de timp copia se află în stare nemetilată, ceea ce determină recrutarea uneia dintre enzimele componente ale MRS care, legându-se la sediul erorii, iniţiază procesul corectării;

— Componentele MRS sunt, cu o singură excepţie (ssb), proteine enzime: MutS (implicată în recunoaşterea erorilor); MutH (o endonuclează a cărei activitate este direcţionată în starea de metilare); MutU (ADN helicaza II care desrăsuceşte monocatenele dublului helix); Ssb (proteine care stabilizează ADN în starea monocatenară); Exo VII (o exonuclează 5′→3′); Exo 5 (o exonuclează 3′→5′); ADN polimeraza III; ADN ligaza;

— Etapele procesului de corectare sunt (figura 2.29):

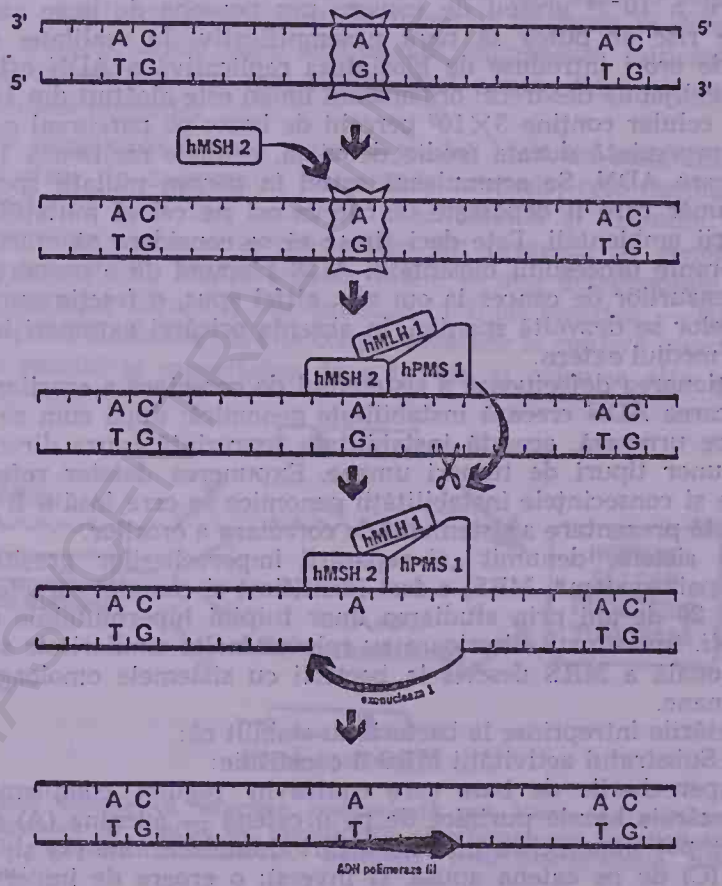


Fig. 2.29. Mecanismul corectării erorilor produse în cursul replicării ADN.

a) legarea MutS la nucleotidele greşit împerecheate;

b) recrutarea de către MutS a enzimelor MutH şi MutL, aceasta din urmă stabilizând complexul MutS-MutH; asamblarea enzimelor activează funcţia endonucleazică a MutH care incizează catena nou sintetizată la nivelul secvenţei GATC aflată încă în stare nemetilată; degradarea exonucleolitică a catenei conţinând defectul de împerechere va demara de la nivelul inciziei şi se va continua dincolo de baza greşit împerecheată; acest proces exonucleolitic este mediat de Exo VII sau de Exo I, în funcţie de poziţia în amonte (5′) şi, respectiv, în aval (3′) a inciziei faţă de sediul încorporării eronate;

c) legarea proteinei Ssb la regiunea rămasă monocatenară, în vederea protejării ei de atacuri nucleolitice;

d) completarea (umplerea) hiatusului prin amplasarea, de această dată corectă (potrivit regulei complementarităţii), a nucleotidelor, urmată de polimerizarea lor de către polimeraza III şi de refacerea de către ADN-ligază a continuităţii catenei.

Diferenţele între sistemul descris la bacterii şi cel care funcţionează în celulele umane nu sunt majore; totuşi, la om, mecanismul discriminării catenelor pare a nu se baza pe starea de metilare, iar în loc de o singură proteină MutL, în celulele umane există forme omologe multiple: hMLH1, hPMS1 şi hPMS2; în plus, proteinei mut S de la *E. coli* îi corespunde o proteină mai asemănătoare cu cea prezentă la Salmonella, motiv pentru care proteinei umane i s-a dat denumirea de hMSH2 („human Salmonela MutS homologue").

Proteinele din alcătuirea MRS sunt codificate de gene ale căror mutaţii compromit funcţionalitatea sistemului, generând instabilitate genomică, evidenţiabilă cu precădere la nivelul repetărilor oligonucleotidice cunoscute sub denumirea generică de microsateliţi.

Peste 90% din ADN nuclear nu codifică proteine. Acest ADN intergenic este alcătuit din repetări (ADN repetitiv) scurte, medii şi lungi. Microsateliţii sunt repetări scurte (di- sau trinucleotidice, ca de exemplu $(CA)_{10-30}$), dispuse în tandem şi dispersate în întregul genom, în care sunt prezente în număr de câteva sute de mii.

Microsatelitii sunt sediul unor variaţii individuale ample, constând în expansiuni si în reduceri ale numărului de repetări, sau în substituţii, inserţii si deleţii nucleotidice.

Aceste variaţii sunt lipsite de consecinte functionale: ele investesc însă microsateliţii cu calitatea de markeri ADN polimorfici, conferindu-le o mare capacitate informativă în ce priveşte segregarea în familii a unor gene prezumtiv patologice. Dacă gena investigată se află în proximitate fizică cu un marker ADN care cosegregă cu trăsătura fenotipică anormală, relatia cauzală între genă şi respectiva anomalie apare a fi înalt probabilă.

Un astfel de marker — D2S123 —, situat pe braţul scurt al cromozomului 2, a fost demonstrat a segrega împreună cu unul dintre cele mai frecvente sindroame ereditare asociate cu tumori maligne — sindromul Lynch.

Incidenţa în populaţie a predispoziţiei pentru acest sindrom este foarte înaltă: un individ din 200 este susceptibil să dezvolte, cel mai adesea înaintea vârstei de 50 de ani, tumori maligne — în special rectocolonice — dar şi cu alte localizări: endometriale, ovariene, gastrice, pancreatice, laringiene, ale căilor urinare etc. (sindromul Lynch II).

Studiile efectuate pe familii manifestând susceptibilitate la astfel de cancere au condus la o constatare surprinzătoare: markerul D2S123 aso-

ciat predispoziției s-a caracterizat prin variații individuale ample în lungimea secvenței sale nucleotidice. Surprinzătoare a fost și constatarea că alți microsateliți, având alte localizări genomice, au prezentat, de asemenea, expansiuni și reduceri ale numărului de nucleotide. Variațiile au fost atribuite erorilor rămase necorectate ale replicării iar fenotipul definit prin incapacitatea reparării a primit denumirea de RER+(„replication error") sau fenotip mutator.

Gena susceptibilității de pe brațul scurt al cromozomului 2, numită inițial FCC („familial colon cancer") și apoi HNPCC („hereditary non polyposis colon cancer"), deoarece mutațiile ei, atât din linia germinală cât și din celulele somatice au fost detectate la o proporție semnificativă a bolnavilor cu cancere colonice non polipozice ereditare (sindromul Lynch I), a devenit ținta unor investigații genetice și moleculare intensive.

În 1993 eforturile grupurilor de cercetători care au cooperat în investigarea genei HNPCC au fost pe deplin răsplătite: ei au stabilit că secvența HNPCC este similară structural și funcțional cu gena MutS de la bacterii, ceea ce reprezintă una dintre cele mai semnificative descoperiri din domeniul biologiei cancerului. S-a demonstrat astfel că în etiopatogenia tumorilor maligne intervin nu numai formele mutante ale protooncogenelor și antioncogenelor, ci și cele ale unei a treia categorii de gene, cunoscute în prezent sub numele de gene de stabilitate.

Instabilitatea genomică, exprimată prin modificări mutaționale prezente la nivelul a zeci de mii de situsuri microsatelit, se întâlnește în aproximativ 15% din tumorile maligne colonice, sporadice și ereditare.

Subgrupul tumorilor cu alterări ale microsateliților (fenotip RER+) se particularizează prin: localizare proximală, debut sub vârsta de 50 de ani, tablou citogenetic relativ normal, prognostic mai bun. Ansamblul acestor trăsături, caracteristice sindromului Lynch I, segregă în familii împreună cu una din următoarele gene aparținând MRS: hMSH2 (2p16), hMLH1 (3p21—23), hPMS1 (2q31—33) sau hPMS2 (7p22).

Predispoziția se transmite dominant, mutațiile genelor menționate fiind prezente în stare heterozigotă în celulele liniei germinale. Celulele normale ale bolnavilor cu tumori conțin o alelă normală și una mutantă, în timp ce în celulele tumorale ambele còpii sunt defective.

Prezența în celule a unei singure còpii funcționale apare a fi compatibilă cu corectarea erorilor replicării pe întregul parcurs al perioadei de dezvoltare și diferențiere; pierderea heterozigozității printr-o a doua mutație la același locus ar atrage după sine incapacitarea sistemului de reparare, cu implicita creștere a ratei mutațiilor, urmată de dezvoltarea tumorilor. Totuși, tranziția de la starea preneoplazică la cea malignă nu se însoțește obligatoriu de pierderea heterozigozității, așa cum se întâmplă în cazul genelor supresoare ale creșterii tumorale. Este posibil ca un alt eveniment, de natură încă neprecizată, să determine suprasolicitarea sistemului, situație în care cantitatea produsului proteic al genei funcționale ar deveni insuficientă, generându-se astfel destabilizarea genomică. Cea de a doua mutație la locusul HNPCC s-ar produce în cadrul acestui proces, accentuând instabilitatea și creând condiții pentru alterarea mutațională a altor gene importante pentru tumorigeneză, cum sunt genele APC, DCC, ras și p53. De altfel, mutațiile acestor gene sunt întâlnite în HNPCC cu frecvențe asemănătoare celor înregistrate în alte tumori rectocolonice.

În ultimii doi ani au fost investigate numeroase tipuri de tumori în vederea decelării unei eventuale instabilităţi genomice. Mutaţii dinamice ale microsatelitilor au fost notate în majoritatea cancerelor extracolonice dezvoltate în cadrul sindromului Lynch II, precum şi în unele neoplasme sporadice cu localizări pulmonare, gastrice, pancreatice, endometriale etc. Proporţia cazurilor pozitive a variat în limite largi, fără a depăşi însă 30%; iar în unele tumori, cum sunt cele testiculare, fenotipul RER+ nu a fost întâlnit niciodată. Neîndoielnic, mecanismul tumorigenezei prin destabilizare genomică nu este unul general; încercările de a îi evalua întreaga semnificaţie sunt premature. O serie de aspecte sunt încă neelucidate: nu se ştie, de pildă, dacă multiplicitatea formelor omologe proteinei MutL de la bacterii reflectă diferenţieri funcţionale impuse de condiţiile specifice unui anumit ţesut sau stadiu de dezvoltare ontogenetică, după cum nu este cunoscut nici modul în care proteinele MRS sunt conectate la alte activităţi celulare prin care se asigură fidelitatea reproducerii şi transmiterii informaţiei genetice. Instabilitatea genomică este prezentă şi în unele boli ereditare neurologice şi neuromusculare: sindromul X fragil, boala Huntington, atrofia musculară spinobulbară Kennedy, distrofia miotonică Steinert, ataxia spinocerebeloasă tip I.

Mutaţiile dinamice răspunzătoare de producerea acestor boli constau în creşteri de zeci şi sute de ori ale unor repetări trinucleotidice; nici una dintre aceste afecţiuni nu se asociază însă cu predispoziţie la cancere. Mai mult decât atât, mutaţii dinamice la nivelul unuia dintre intronii genei hMSH2 au fost observate la 10% din indivizii normali.

În pofida acestor necunoscute, există totuşi o certitudine: cel puţin în sindroamele Lynch, rolul etiologic în carcinogeneză revine mutaţiilor suferite de genele de stabilitate, iar analiza markerilor ADN asociaţi acestor gene este în măsură să informeze asupra predispoziţiei la dezvoltarea tumorilor — prezentă la 0,5% din populaţia generală.

2.2.17. MODELE GENETICE ALE TUMORIGENEZEI UMANE

Acţiunile de explorare şi catalogare a modificărilor genetice din cancere sunt încă departe de a se fi încheiat, iar relaţiile temporale şi cauzale dintre variatele modificări identificate până în prezent continuă să constituie obiectul unor speculaţii. Cu toate acestea, cel puţin pentru unele forme de cancere, s-a reuşit construirea unor modele care „coerentează" satisfăcător portretele genetice cu aspectele morfologice, clinice şi epidemiologice. Oportunitatea realizării unor astfel de modele este evidentă deoarece: cu ajutorul lor poate fi stabilită, prin analogie, semnificaţia anomaliilor genetice prezente în alte tumori; stadializarea bolii canceroase devine mai obiectivă şi mai precisă; acurateţea evaluării prognosticului creşte semnificativ; se creează premisele depistării prin screening genetic a predispoziţiei la cancer şi, implicit, cele ale aplicării tratamentelor preventive.

Prezentarea selectivă, în cele ce urmează, a unor modele genetice ale oncogenezei umane are drept scop atât detalierea conceptelor discutate în paragrafele precedente şi ilustrarea lor cu exemple demonstrative, cât şi evidenţierea laturii aplicative a cunoştinţelor privitoare la biologia celulei canceroase.

2.2.17.1. Modelul genetic al dezvoltării cancerelor pediatrice

Majoritatea cancerelor pediatrice își au originea în tipuri celulare prezente exclusiv în stadiile embrionare și fetale. De regulă, celulele aparținând unor astfel de tipuri își încheie procesul de diferențiere înainte sau la scurt timp după naștere, devenind celule postmitotice, neproliferante. Rezultă că evenimentele inițiatoare ale dezvoltării cancerelor pediatrice trebuie să se producă anterior intrării celulelor în stadiul postmitotic, și anume în cursul vieții intrauterine, ceea ce, de altfel, explică și precocitatea debutului clinic.

Cele mai multe cancere pediatrice apar sporadic; există însă și forme ereditare, care se deosebesc de corespondentele lor sporadice printr-o serie de particularități (unele dintre acestea au fost menționate în paragraful 2.1.2.1.). Analiza diferențelor existente între forma ereditară și cea sporadică a unuia dintre cancerele pediatrice — retinoblastomul — a condus la elaborarea modelului genetic al dezvoltării cancerelor pediatrice denumit modelul Knudson sau „al celor două evenimente".

Retinoblastomul este o tumoră a celulelor retiniene; cu rare excepții, tumora debutează în primii 4 ani de viață; aproape jumătate din cazurile de retinoblastom sunt ereditare și se caracterizează prin prezența de tumori multifocale, bilaterale, ce se dezvoltă încă din primele luni de viață; transmiterea este autozomal-dominantă. În cazurile sporadice tumorile sunt unilaterale, monocentrice, iar debutul se produce mai târziu.

Tratamentul este chirurgical și comportă enuclearea ochiului afectat. Pacienții cu retinoblastom ereditar care se vindecă în urma operației au un risc înalt de a dezvolta, în adolescență sau la vârsta adultă, alte neoplazii maligne, în special osteosarcoame și tumori genito-urinare. Acest risc este absent la bolnavii cu retinoblastom sporadic.

Diferențele între formele ereditare și cele sporadice au primit următoarea explicație.

Bolnavii cu retinoblastom ereditar sunt purtători ai unei mutații care s-a produs în celulele germinale ale unuia dintre părinți. Fiind transmisă prin gameți, mutația va fi prezentă în toate celulele organismului dar — datorită unor particularități specifice celulelor precursoare neurale din retina imatură — se va exprima exclusiv la descendentele acestora (celule fotoreceptoare și celule ganglionare). Deficitul creat prin disfuncția alelei mutante este compensat de gena omologă normală. Dacă funcția genei normale este abolită printr-un al doilea eveniment mutațional, celula devenită homozigotă pentru alela mutantă va suferi transformarea malignă. Acest al doilea eveniment se produce aleatoriu, într-un număr limitat de retinoblaști sau de retinocite.

Întrucât mutația inițială, moștenită de la unul dintre genitori este prezentă și în celulele liniei germinale, jumătate din descendenții bolnavilor cu retinoblastom vor fi susceptibili să dezvolte această formă de neoplasm.

În cazul retinoblastomului sporadic ambele evenimente mutaționale sunt prezumate a se produce după fertilizare, într-o aceeași clonă de celule retiniene, ceea ce explică afectarea unilaterală, caracterul monocentric al tumorilor și vârsta mai târzie de debut (producerea a două mutații succesive la loci omologi necesită un interval lung de timp). Dat fiind că retinoblastomul sporadic este consecința unor mutații care afectează ex-

clusiv celule somatice, riscul descendenților de a dezvolta tumora nu diferă de cel înregistrat în populația generală.

Rezultatele studiilor citogenetice, împreună cu datele obținute prin analiza segregării în familii a unor markeri ADN, au validat modelul Knudson, demonstrând că ambele evenimente au loc la nivelul aceleeași gene — denumită Rb —, al cărei sediu se află pe brațul lung al cromozomului 13 (13q14). Dezvoltarea tumorii este condiționată de pierderea sau inactivarea celor două copii ale genei Rb (vezi figura 2.19).

Natura evenimentelor postulate de modelul Knudson ca fiind inițiatoarele procesului de tumorigeneză poate fi diferită. Primul eveniment, cel care conduce la starea de heterozigozitate, a fost prezumat a fi unul mutațional. Mecanismele prin care se realizează al doilea eveniment, în urma căruia celula își pierde heterozigozitatea devenind homozigotă pentru mutația sau lipsa genei Rb, sunt multiple (vezi fig. 2.20):

— pierderea prin nondisjuncție a întregului cromozom 13 normal, urmată sau nu de reduplicarea cromozomului 13 purtător al genei defective; în cazul în care are loc reduplicarea, rezultă disomia uniparentală (ambii cromozomi omologi provin de la același părinte);

— recombinarea mitotică, prin care se produce un schimb de material genetic între cromozomii omologi; când recombinarea interesează regiunea 13q14, în care se află alela Rb mutantă, una dintre celulele fiice va deveni homozigotă pentru alterarea genei Rb, iar cealaltă — homozigotă pentru alela normală ;

— mutația sau microdeleția alelei normale;

— conversia genică.

Modelul inactivării secvențiale a genelor supresoare ale creșterii tumorale elaborat de Knudson oferă o imagine corectă și aproape completă asupra modului în care se produce inițierea celor două forme sub care apar cancerele pediatrice. Un aspect rămâne, totuși, neexplicat, și anume cel al comutării preferențiale la starea de heterozigozitate. S-a constatat că, în marea majoritate a cancerelor pediatrice, evenimentul inițial afectează specific și exclusiv alelele provenite de la un singur părinte. Cu rare excepții, copia inactivată este cea paternă.

Inactivarea preferențială, și consecința ei directă — transmiterea predispoziției prin părinții aparținând unui singur sex — își găsesc o explicație plauzibilă în fenomenul amprentării genomice.

2.2.17.1.1. *Amprentarea genomică („genomic imprinting"): implicații posibile în etiopatogeneza cancerelor*

Contrar postulatelor geneticii clasice, contribuția celor doi gameți — patern și matern — la edificarea organismului și la realizarea fenotipului progenilor se dovedește a nu fi echivalentă ci, mai curând, complementară și, în unele privințe, chiar diferită.

Informații de dată recentă relevă că exprimarea alelelor unor gene este puternic condiționată de sexul părintelui care le transmite. Altfel spus, există situații în care numai una dintre alelele unui locus este transcripțional activă și, ca urmare, în fenotip va fi imprimată trăsătura moștenită de la un singur părinte.

Exprimarea sau represarea genelor în funcție de gametul de origine definește fenomenul de amprentare genomică.

Acest fenomen este larg răspândit în lumea vegetală și animală. La mamifere, importanța originii parentale a materialului genetic este dovedită de două categorii principale de informații: unele furnizate de experimentele de inducere a partenogenezei, celelalte — de studiile privind comportamentul transgenelor.

Inserarea în zigotul de șoarece a doi pronuclei având aceeași origine parentală se soldează întotdeauna cu eșecul dezvoltării: după parcurgerea primelor etape ale segmentării, embrionii își încetează dezvoltarea și mor. De notat însă că răspunzătoare de moartea embrionilor androgenetici sau ginogenetici sunt numai disomiile uniparentale ale anumitor cromozomi. Apare clar că pentru desfășurarea normală a embriogenezei este necesară prezența alelelor provenite de la ambii părinți. Explicația rezidă în amprentarea diferită a alelelor paternă și maternă. În cazul disomiilor uniparentale, amândouă alelele pot fi amprentate și, implicit, nefuncționale, stare care este incompatibilă cu dezvoltarea partenogenoților.

În ce privește experimentele efectuate pe animale transgenice, acestea au arătat că amprentarea genei artificial inserate se menține — în generații succesive — strâns asociată cu sexul părintelui transmițător. Mecanismele amprentării apar astfel a fi dependente de sex.

Substratul molecular al amprentării genomice constă, cel mai probabil, în metilarea reziduurilor citozinice din repetările dinucleotidice CG, abundente în vecinătatea situsurilor de inițiere a transcripției și în elementele de control al activității genelor (promotori și intensificatori).

Metilarea citozinei, catalizată de enzimele denumite hipometilaze (ADN metiltransferaze), ar echivala cu blocarea transcripției. Relația negativă între gradul metilării și intensitatea exprimării genice s-a demonstrat a fi mediată atât prin modificări inerente ale structurii cromatinei, cât și prin legarea la situsurile metilate a unor proteine specifice prezumate a împiedica accesul factorilor de transcriere. În contradicție cu această concepție sunt observațiile care relevă existența unor alele metilate care își păstrează capacitatea de a fi transcrise. În cazul acesta, metilarea ar interesa secvențe dinucleotidice CpG aflate în interiorul genei și despre care se presupune că ar interfera cu legarea unor represori transcripționali.

Acesta nu este, de altfel, singurul aspect neelucidat al semnificației metilării. Nu se știe, de pildă, cum și de ce în stadiul de morulă are loc o demetilare globală a genomului, urmată de o restabilire a patternului metilării coincidentă cu momentul implantării oului. Nu sunt, de asemenea, suficient cunoscute sistemele genice de control al metilării, sau diferențele între metilazele specifice testiculului și ovarului, răspunzătoare de amprentarea diferențială a alelelor paterne și materne, după cum insuficient cunoscuți sunt și markerii proteici ai identității parentale a alelelor.

Paragraful de față nu are drept scop prezentarea exhaustivă a datelor despre amprentarea genică prin metilarea repetărilor CpG, ci intenționează să evidențieze doar posibila semnificație a acestui proces pentru etiopatogenia cancerelor.

Totuși, înainte de comentarea rolului amprentării genomice în cancer, se impune a fi prezentată o situație din patologia genetică, deosebit de ilustrativă pentru contribuția esențial diferită a celor două alele parentale la realizarea unor anomalii fenotipice.

Sindroamele Prader—Willi şi Angelman sunt două afecţiuni clinic distincte dar care se caracterizează, în majoritatea cazurilor, printr-o aceeaşi anomalie citogenetică, şi anume deleţia interstiţială 15q11q13.

Manifestările clinice în sindromul Prader—Willi includ întârzierea mentală moderată, hipotonia infantilă, hipogenitalism, hipostatură, hiperfagie urmată de obezitate.

În sindromul Angelman tabloul clinic cuprinde întârzierea mentală severă, ataxie, hiperactivitate, convulsii, crize frecvente de râs.

S-a constatat că în cazurile în care este prezentă deleţia 15q11q13, bolnavii la care copia normală (fără deleţie) a cromozomului 15 provine de la mamă prezintă semnele sindromului Prader—Willi, iar cei la care cromozomul 15 normal este de origine paternă se încadrează în sindromul Angelman. La bolnavii la care deleţiile microscopice sau submicroscopice sunt absente, analiza markerilor cromozomiali şi a polimorfismelor ADN a evidenţiat disomii uniparentale; în sindromul Prader—Willi ambele cópii ale cromozomului 15 apar a fi de proveniență maternă, în timp ce în sindromul Angelman originea celor doi cromozomi 15 este paternă.

Se impun următoarele concluzii: a) genele din regiunea 15q11q13 sunt amprentate diferit în gametogeneza paternă şi în cea maternă; b) prezenţa alelelor transmise de fiecare părinte este indispensabilă dezvoltării normale: cópiile adiţionale provenite de la acelaşi părinte nu pot suplini lipsa genei transmisă de părintele de sex opus.

Disomiilor uniparentale li s-a atribuit un rol potenţial în etiologia tumorilor. În afară de tumorile dezvoltate din ţesuturi embrionare — mola hidatiformă şi teratomul de ovar — în care disomiile uniparentale sunt globale (mola hidatiformă este androgenetică, iar teratomul de ovar — partenogenetic), cel puţin un sindrom genetic uman asociat cu predispoziţie marcată la cancer este cunoscut a avea printre cauze o disomie uniparentală. Acesta este sindromul Beckwith—Wiedemann (SBW), caracterizat prin gigantism, creşteri de volum ale organelor interne, omfalocel; peste 60% din bolnavi dezvoltă tumori embrionare: tumoră Wilms, hepatoblastom, rabdomiosarcom. În 20% din cazuri se evidenţiază o disomie uniparentală a regiunii 11p15, consecinţă a unei duplicări parţiale produsă în cursul gametogenezei paterne.

La nivelul regiunii 11p15 se află gena care codifică factorul de creştere II similar insulinei (IGF2). În celulele normale funcţionează o singură copie a genei IGF2 — cea paternă —, alela maternă fiind inactivată prin amprentare.

În organismele disomice supradozarea genică şi implicita dublare a producţiei de IGF2 creează condiţii pentru o proliferare celulară excesivă (IGF2 este un important factor autocrin de stimulare a creşterii normale şi neoplazice implicat în dezvoltarea mai multor tipuri de tumori care apar la copii şi adulţi).

În cazurile de SBW fără disomie paternă, producerea tumorilor apare a se datora dezamprentării alelei IGF2 maternă; consecinţa este aceeaşi — supraproducţia de IGF2 şi creşterea ratei proliferării celulare.

Dezamprentarea (pierderea sau relaxarea amprentării) este un fenomen situat actualmente în centrul atenţiei unor grupuri de cercetători din domeniul oncogeneticii deoarece sunt tot mai numeroase datele care îl plasează printre principalele mecanisme declanşatoare ale creşterii tumorale.

Examinarea stării de amprentare a alelei IGF2 materne în celulele tumorii Wilms (TW) a condus la rezultate deosebit de sugestive pentru importanța fenomenului de relaxare a amprentării genomice. În TW leziunea genetică este localizată, ca și în SBW, la nivelul brațului scurt al cromozomului 11, într-o regiune care a primit denumirea WAGR deoarece TW este frecvent asociată cu aniridie, anomalii genitourinare și retard mental. Această regiune, având o întindere de câteva megabaze și reprezentând ca atare sediul mai multor gene, este implicată și în geneza hepatoblastoamelor și rabdomiosarcoamelor embrionare, precum și a unor tumori ale adultului.

Dintre genele localizate în această regiune, drept candidate pentru un rol etiologic în dezvoltarea TW au fost desemnate IGF2 și H19. În 70% din TW care nu se datorează pierderii heterozigozității pentru prezumtiva antioncogenă aflată în zona WAGR, analizele moleculare relevă exprimarea bialelică a genei IGF2, explicată prin relaxarea amprentării alelei materne. Studii recente situează relaxarea amprentării pe primul loc în determinismul TW, demonstrând că dezamprentarea este de 2—5 ori mai frecventă decât pierderea heterozigozității și decât alterările mutaționale.

Observațiile privind pierderea amprentării genomice au dus la formularea următoarei ipoteze: printre funcțiile amprentării ar figura represarea uneia dintre alelele genelor care promovează proliferarea celulară; o etapă a tumorigenezei ar fi reprezentată de supraexprimarea acestor gene subsecventă unei disturbări a mecanismelor de amprentare, produsă în cadrul mai larg al modificărilor stării de metilare a ADN, și dovedite a fi ubicuitare în celulele premaligne și maligne; aceste modificări comportă atât hipometilarea unor regiuni ale genomului, cât și hipermetilarea altora; în cazul în care alela inactivă a unei gene promotoare a creșterii devine hipometilată, amprentarea se pierde, consecința fiind — ca și în situația disomiilor uniparentale — supraproducția unui factor de creștere și, implicit, intensificarea proliferării celulare.

Revenind la modelul Knudson, se poate afirma că acesta, reformulat în termenii derivați din conceptul amprentării genomice, satisface integral cerințele rezultate din analiza datelor clinice și statistice referitoare la cele două forme ale retinoblastomului.

În noul context, evenimentul inițial în dezvoltarea formelor ereditare apare a fi amprentarea aberantă, în gametogeneza paternă, a alelei Rb, ceea ce explică transmiterea preferențială.

Modelul Knudson se aplică, de asemenea, și dezvoltării celorlalte tumori embrionare, dacă determinismul acestora comportă inactivarea unei gene supresoare a creșterii tumorale. În mod evident, modelul este inaplicabil situațiilor în care transformarea neoplazică se datorează activării unor gene a căror funcție rezidă în promovarea proliferării celulare. În pofida faptului că cele două mecanisme sunt divergente — inactivarea GSCT și activarea genelor promotoare ale creșterii — ele au, totuși, un numitor comun, reprezentat de alterările stării de amprentare genomică.

2.2.17.2. Modelul genetic al dezvoltării cancerelor rectocolonice (CRC)

În țările dezvoltate CRC reprezintă — după cancerul pulmonar — a doua cauză de morbiditate și mortalitate prin boala neoplazică.

Cele mai multe CRC rezultă prin malignizarea unor tumori benigne precursoare — polipii adenomatoși.

Contribuţia factorilor ereditari în determinismul CRC este diferită: majoritatea cazurilor apar a fi sporadice; în unele cazuri agregarea familială este evidentă, ceea ce demonstrează existenţa unei predispoziţii transmisă ereditar; în 15% din cazuri boala se datorează acţiunii exclusive a unei singure gene patologice cu transmitere autozomal dominantă şi penetranţă completă.

Toate aceste trăsături, la care se adaugă facilitatea explorării şi prelevării de material biopsic prin fibrocolonoscopie, fac din CRC sistemul de elecţie pentru investigarea alterărilor genetice implicate în dezvoltarea cancerelor comune. De altfel, cele mai numeroase şi consistente informaţii referitoare la profilul genetic al tumorilor solide sunt cele pe care le-au furnizat cercetările efectuate în CRC.

În paragrafele următoare vor fi prezentate principalele categorii de informaţii privind anomaliile genetice din CRC, a căror asamblare şi integrare au făcut posibilă construirea modelului tumorigenezei rectocolonice.

2.2.17.2.1. *Modificări cariotipice în CRC*

Adenocarcinoamele se caracterizează prin prezenţa de anomalii cromozomiale complexe, atât numerice cât şi structurale. Aproximativ jumătate din tumorile examinate au apărut a fi alcătuite din celule heteroploide (hipotriploide şi hipotetraploide), cu numeroşi cromozomi markeri de origine neprecizată. Tumorile colonului distal tind să aibă numere cromozomiale mai mari decât cele ale colonului drept. Aneuploidia este, cel mai adesea, rezultatul adiţiei unui cromozom 7 sau a pierderii unuia din cromozomii 18 şi 22. Pierderea cromozomului 4 este, de asemenea, frecventă. În rearanjările structurale sunt implicaţi, în ordinea descrescătoare a frecvenţei, cromozomii 1, 3, 11, 17, 6, 8, 13, şi 20. Aberaţiile structurale ale cromozomilor 3 şi 11 sunt întâlnite mai ales în tumorile părţii distale a tubului digestiv: în carcinomul cu celule scuamoase al canalului anal anomaliile cele mai des observate sunt deleţiile 11q şi 3p.

Unele configuraţii cariotipice normale prezintă un interes special, determinat de faptul că în regiunile cromozomiale implicate în anomalii îşi au sediul gene de importanţă majoră în etiopatogenia CRC. Pe braţele lungi ale cromozomilor 5 şi 18 se află genele APC, MCC şi, respectiv, DCC, iar pe braţul scurt al cromozomului 17 este localizată gena p53. Deleţiile alelice ale acestor regiuni se produc secvenţial, corelându-se cu evoluţia tumorii. Pe lângă aceste monosomii, în tumorile avansate pot fi întâlnite şi deleţiile alelice 1p, 4p, 6p, 6q, 8p şi 13q.

În adenoamele colonice, atât sporadice cât şi familiale, au fost, de asemenea, detectate anomalii cromozomiale, prevalent numerice (trisomii 2, 6, 7, 8, 13, 14, 20), fapt care dovedeşte că alterările cariotipice constituie evenimente precoce în dezvoltarea CRC.

Anomaliile cromozomiale sunt prezente nu numai în ţesutul tumoral: limfocitele periferice ale unora dintre bolnavii cu CRC s-au dovedit a fi purtătoare de aberaţii cromozomiale clonale (hiper- şi hiposomii ale cromozomului X, monosomii 19, 21 şi 22, inversiuni 12, diferite deleţii).

Demn de notat este şi faptul că cromozomii limfocitelor prelevate de la bolnavii cu tumori benigne sau maligne colorectale manifestă o susceptibilitate crescută la acţiunea agenţilor clastogeni administraţi *in vitro*.

Răspunsurile anormale, exprimate prin niveluri ale frecvenței aberațiilor induse de clastogeni, semnificativ mai înalte comparativ cu martorii, ar putea să reprezinte indicatori ai predispoziției genetice la dezvoltarea CRC.

2.2.17.2.2. *Alterări genice în CRC*

În etiopatogenia CRC intervin reprezentante ale fiecăreia din cele trei categorii de gene implicate în cancer: oncogene, GSCT și gene de stabilitate.

Deși dinamica aspectelor moleculare poate prezenta variații dependente de tipul morfoclinic și de caracterul sporadic sau ereditar al tumorilor, evoluția oricărui CRC comportă parcurgerea unor etape obligatorii, comune tuturor formelor, și definite prin alterările mutaționale ale anumitor gene.

Evoluția moleculară a CRC se caracterizează prin următoarele trăsături:

— tumorile apar ca urmare a inactivării unor GSCT și a activării mutaționale a unor oncogene;

— emergența fenotipului malign este precedată de producerea a cel puțin 4—5 evenimente mutaționale; realizarea fenotipului neoplazic (tumori benigne) reclamă un număr mai redus de mutații;

— dobândirea malignității este condiționată de acumularea unui număr critic de mutații și mai puțin de secvența cronologică a achiziționării acestora.

În ordinea frecvenței cu care sunt întâlnite, și care corespunde, în general, secvenței temporale a producerii lor, alterările mutaționale din CRC interesează următoarele gene: APC, DCC, p53, K-ras și MCC.

Gena APC, situată pe brațul lung al cromozomului 5, codifică o proteină cu rol modulator al interacțiunii dintre caderine (molecule de adeziune celulară de la nivelul zonulei adherens) și catenine (proteine citoplasmatice care realizează ancorarea joncțiunilor de aderență la microfilamentele de actină ale citoscheletului). Mutațiile APC perturbă transmiterea semnalelor prin intermediul cărora interacțiunile dintre celule controlează creșterea și diferențierea. Acestor mutații li s-a atribuit un rol în chiar inițierea procesului de hiperplazie deoarece apar a fi prezente încă din cele mai timpurii stadii de dezvoltare a adenoamelor iar frecvența lor se păstrează constantă pe întregul parcurs al tumorigenezei. Peste 70% din CRC și aproximativ 63% din adenoame conțin alterări ale APC, în marea lor majoritate deleții mici și mutații punctiforme rezultate prin tranziții C→T; proporția mutațiilor produse prin transversii GC→TA este foarte redusă, sugestivă pentru rolul limitat al mutagenilor externi în carcinogeneza colorectală.

Alterările APC din celulele liniei germinale sunt prezente la 90% din bolnavii cu FAP, cele mai multe apărând sub formă de deleții și mutații nonsens care trunchiază produsul genic. Una dintre aceste mutații, o deleție de 5 perechi de baze din codonul 1 309, se face răspunzătoare de 10—15% din alterările APC întâlnite în celulele liniei germinale.

Gena MCC este alterată mutațional în 40% din tumorile rectocolonice dar, spre deosebire de APC, mutațiile ei nu au fost niciodată întâlnite în celulele liniei germinale. MCC și APC sunt, amândouă, situate în re-

giunea 5q21, frecvent deletată în formele familiale de CRC. Se consideră că produșii proteici ai celor două gene participă la realizarea unei aceleiași căi de semnalizare care în urma deleției 5q21 ar deveni nefuncțională.

Genele ras (în special K-ras) prezintă un spectru larg de mutații activatoare, decelabile în aproximativ 50% din adenoamele colonice avansate (cu diametru mai mare de 1 cm) și în peste 50% din CRC. În adenoamele mici frecvența acestor mutații nu depășește 10% Mutațiile genelor ras apar, așadar, a fi evenimente premergătoare transformării maligne, fapt sugestiv ilustrat și de observațiile potrivit cărora mutațiile ras sunt prezente atât în zonele adenomatoase cât și în cele carcinomatoase ale unei aceleiași tumori.

Gena DCC, care codifică o proteină asemănătoare moleculelor neuronale de adeziune celulară, se află situată pe brațul lung al cromozomului 18. Pierderile alelice 18q se înregistrează în 75% din CRC și în 47% din adenoamele mari. Date fiind funcțiile proteinei DCC în modularea interacțiunilor între celulele învecinate și între celule și matricea intercelulară, inactivării DCC i se atribuie un rol important în dobândirea capacității de invazie și metastazare.

Gena p53 este situată pe brațul scurt al cromozomului 17, ale cărui deleții sunt notate în 75% din CRC, în 50% din adenoamele avansate și în numai 10% din adenoamele mici. În mai mult de 90% din CRC în care s-au produs deleții 17p, alela restantă a genei p53 apare a fi inactivată mutațional. Mutațiile inactivatoare ale ambelor copii ale p53 se observă mai rar (23% din carcinoame și 65% din adenoame). Ansamblul datelor privitoare la efectele alterării genei p53 atestă că inactivarea acestei gene este un eveniment tardiv în cancerogeneza colorectală, corelat mai curând cu progresiunea tumorii decât cu transformarea neoplazică. În acest sens pledează și rezultatele experimentelor *in vitro* care demonstrează că transfecția unei alele normale a p53 suprimă creșterea celulelor provenite din CRC dar nu influențează parametrii proliferării celulelor adenomatoase.

Alte modificări genetice raportate a se produce în cursul evoluției CRC sunt:

a) pierderile alelice din regiunile cromozomiale 1p, 4p, 6p, 9q, 13q, 14q, și 22q;

b) activarea protooncogenelor c-myc, neu, c-src;

c) alterările globale ale stării de metilare a ADN (în special hipometilări) consecutive anomaliilor survenite în activitatea citozin-ADN-metiltransferazei. Acestea din urmă sunt decelabile din cele mai timpurii stadii de dezvoltare a adenoamelor, fiind prezente chiar și în zonele de mucoasă aparent nemodificată histologic prelevată de la bolnavii cu neoplazii colorectale.

Asamblarea observațiilor privitoare la alterările moleculare din CRC a făcut posibilă construirea modelului redat în figura 2.30 potrivit căruia mutațiile produse la nivelul 5q reprezintă evenimentul inițiator al dezvoltării cancerelor colorectale, atât sporadice cât și ereditare; pe fondul stării de hipometilare se produce activarea genelor ras care, deși timpurie, nu este esențială pentru formarea adenoamelor; în adenoamele avansate au loc deleții alelice ale regiunilor 18q și 17p, răspunzătoare de conversia la malignitate și, prezumabil, de activarea enzimelor proteolitice care degradează componentele membranei bazale dotând celulele canceroase cu potențial invaziv și metastazant.

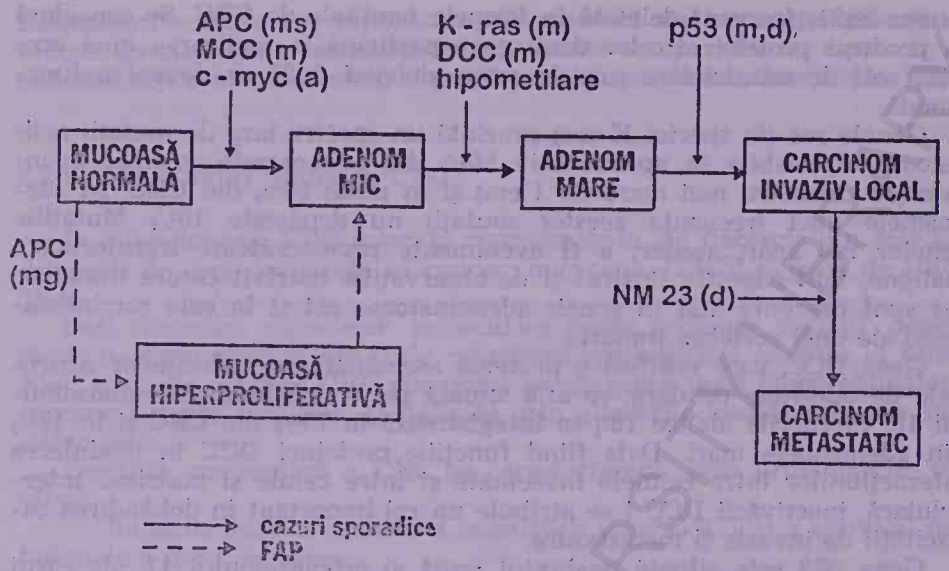


Fig. 2.30. Modelul genetic al tumorigenezei colorectale:
m = mutaţie; mg = mutaţie în celulele liniei germinale; ms = mutaţie somatică; a = amplificare; d — deleţie.

Modelul prezintă secvenţa temporală cel mai frecvent observată în carcinogeneza colorectală (denumită de aceea ruta majoră) dar ordinea producerii evenimentelor nu este obligatoriu aceeaşi pentru toate tumorile colorectale. Trebuie, de asemenea, menţionat că modelul nu corespunde tuturor tipurilor de CRC. Modul particular al dezvoltării cancerului colonic nonpolipozic ereditar a fost prezentat în paragraful 2.2.16.

2.2.17.2.3. *Procesul de metastazare se află sub control genetic dar genele răspunzătoare nu sunt încă identificate*

Cascada evenimentelor care conduc la dobândirea potenţialului invaziv şi metastazant se amorsează după ce tumorile primare ajung într-o anumită etapă a dezvoltării lor — corelată, în general, cu următorii parametri: diametrul tumorii — 1 cm; dimensiunile populaţiei celulelor maligne — 10^9; numărul de dublări — 30; fracţia de creştere — 20%. În acest stadiu celulele tumorale devin mobile, invazive, deformabile şi capabile să determine retracţia celulelor endoteliale, ceea ce le permite intravazarea şi implicita migrare în alte ţesuturi şi organe. Unele dintre celulele emigrate se află în stadiul G0 în care rămân — total insensibile la chimioterapie — perioade lungi de timp (de ordinul anilor), după care, sub influenţa unor factori necunoscuţi, reintră în ciclul celular şi încep să prolifereze activ. Se consideră că astfel de celule, răspunzătoare de dezvoltarea metastazelor târzii, se desprind din toate tumorile maligne, prezenţa lor în organele ţintă fiind demonstrată de investigaţiile efectuate cu tehnicile geneticii moleculare. Alte celule se desprind din tumori într-un moment în care sunt angajate în parcurgerea ciclului celular, iar stabilirea lor în situsurile receptoare este urmată de apariţia metastazelor tim-

purii. Celulele acestor tumori secundare au un potențial proliferativ înalt și se caracterizează prin rezistența la agenți citostatici, uneori chiar la cei cu care nu au venit niciodată în contact.

Capacitatea de metastazare este conferită de o serie de modificări genetice — altele decât cele care dotează celula cu proprietatea creșterii nelimitate.

Genomul tuturor celulelor conține un program de mobilizare și invazie. Acest program este utilizat în condiții fiziologice de celulele endoteliale în cursul angiogenezei, în embriogeneză și în morfogeneză, precum și de trofoblaști în perioada implantării. Diferența fundamentală între celulele normale și cele neoplazice constă în faptul că mobilitatea primelor dispare o dată cu dispariția stimulului fiziologic (celulele endoteliale) sau cu inițierea procesului de diferențiere (trofoblaști); în contrast cu acestea, celulele tumorale sunt comutate perpetuu pe programul de invazie. Pentru a realiza invazia și metastazarea, celulele maligne utilizează, așadar, un program preexistent și căi preformate de transducție a semnalelor. În celulele maligne aceste căi sunt în permanență activate sau dezinhibate.

Sistemul care guvernează realizarea programului de invazie este complex și presupune participarea a cel puțin două clase de proteine. Unele acționează la suprafața celulelor și asigură recepția semnalelor, interacțiunile cu matricea intercelulară și pierderea adezivității; acestea sunt ectokinaze și ectofosfataze care funcționează atât ca receptori pentru inhibitorii proteinkinazelor cât și ca receptori pentru liganzii care determină degradarea moleculelor de adeziune și stimulează mobilizarea celulelor. Existența acestor proteine de suprafață nu este însă suficientă pentru dobândirea capacității de mișcare. O altă clasă de proteine, de această dată intracelulară, include componente ale citoscheletului, proteine care se leagă la actină, elemente de transducție a semnalelor și numeroase molecule care formează bucle de feedback; prin intermediul acestora sunt activate și controlate adecvat mecanismele locomoției.

Identificarea proteinelor din alcătuirea acestui sistem și a genelor care le codifică este esențială pentru înțelegerea modului în care se realizează metastazarea. Cunoștințele actuale despre controlul genetic al metastazării sunt relativ sumare și se bazează în mare măsură pe informații indirecte, provenite din analiza consecințelor pierderii GSCT și ale activării oncogenelor asupra comportamentului celulelor maligne.

Potrivit unui raționament simplu, cu cât o alterare genică survine mai târziu în evoluția unei tumori, cu atât mai probabilă este implicarea ei în procesul de metastazare. În general, numărul de loci genici la nivelul cărora se observă pierderi ale heterozigozității crește în paralel cu progresiunea tumorilor, ceea ce sugerează că inactivarea GSCT ar putea fi mai importantă pentru metastazare decât modificările altor gene.

În cancerele colorectale pierderea heterozigozității pentru genele p53 și DCC — evidențiate de delețiile 17p și 18q — se asociază invariabil cu conversia la fenotipul malign. Ca atare, derepresarea programului de invazie a fost considerată a fi o consecință a inactivării alelice a GSCT p53 și DCC. Concluzia este întărită de observațiile potrivit cărora metastazele hepatice ale CRC prezintă în proporție de 100% deleții 17p și 18q. În plus, în metastaze frecvența delețiilor 1p, 13q și 14q este mai înaltă decât în tumorile primare, iar în unele cazuri pierderea heterozi-

gozității pentru regiunile 13q și 14q apare a se produce ulterior colonizării ficatului.

Dacă se consideră că la nivelul 1p și 14q sunt situate GSCT încă neidentificate (13q fiind cunoscut ca sediul al genei Rb), rezultă că metastazarea CRC este condiționată de acumularea unor alterări care, acționând concertat cu alterările p53 și DCC, se fac răspunzătoare de dotarea cu potențial invaziv a celulelor tumorale.

Implicarea genei p53 în procesul de metastazare este certificată și de rezultatele investigațiilor efectuate în alte tipuri de cancere. În tumorigeneza hepatică inactivarea p53 este determinantă pentru progresiunea către starea mai puțin diferențiată și mai agresivă a celulelor tumorale. În cancerele mamare pierderea alelică p53, împreună cu delețiile 3p, 13q, 16, și cu amplificarea oncogenei erbB-2, determină creșterea gradului de malignitate și a potențialului invaziv. Evoluția histologică a tumorilor cerebrale de la astrocitom la glioblastom comportă expansiunea clonală a celulelor în care au fost inactivate ambele copii ale genei p53 și ale unei prezumtive gene de supresie de pe cromozomul 10. Acestor constatări care incriminează alterările p53 în metastazare li se opun observațiile potrivit cărora pierderea heterozigozității și mutațiile p53 reprezintă — în unele cancere — evenimente precoce, asociate mai curând cu promovarea decât cu progresiunea tumorilor. Un exemplu în constituie prezența alterărilor p53 în zonele hiperplazice ale epiteliului bronșic la bolnavii cu cancere pulmonare cu celule mici.

O aceeași genă poate, așadar, să intervină fie în inițierea și promovarea unor tipuri histologice de cancere, fie — dar obligatoriu în cooperare cu alte modificări genetice — în progresiunea și metastazarea altor tipuri.

O abordare virtual capabilă să contribuie la elucidarea controlului genetic al metastazării este aceea a stabilirii de linii celulare *in vitro* în care alterările expresiei unor gene sau anumite modificări cariotipice să se asocieze cu pierderea sau dobândirea potențialului metastazant. Utilizarea unor astfel de modele a permis identificarea unei gene — denumită nm23 — care, transfectată în celulele melanomelor maligne, determină abolirea capacității de metastazare. Ulterior s-a constatat că inactivarea mutațională în celulele cancerelor mamare a acestei gene se corelează cu invazivitatea. Mai recent s-a arătat că transferul cromozomului uman 11 în celulele puternic metastazante ale unei linii de cancer prostatic de șobolani suprimă capacitatea de metastazare fără a diminua tumorigenicitatea; transferul cromozomului uman 8 conduce la același rezultate. Întrucât delețiile brațului scurt al cromozomului 8 (8p22) sunt frecvent observate în cancerul prostatic uman, precum și în carcinoamele hepatice, vezicale, pulmonare și colorectale, se consideră că această regiune conține una sau chiar două gene de supresie a metastazării. Aceste gene nu au fost încă identificate și clonate.

2.2.17.2.4. *Aplicații clinice ale geneticii moleculare în cancerele colorectale*

Nici una dintre alterările genetice prezente în CRC nu face încă obiectul investigațiilor de rutină. Momentul introducerii diagnosticului ADN în arsenalul de metode ale practicii curente nu poate fi, totuși, prea înde-

părtat: informativitatea — incomparabil mai mare decât cea a oricărui alt tip de teste disponibile în prezent —, gradul înalt de sensibilitate și specificitate sunt caracteristicile care impun implementarea neîntârziată a analizei ADN. În pofida costului relativ ridicat și a necesarului de aparatură și de personal calificat, raportul beneficiu/cheltuieli nu poate fi decât unul avantajos pentru sănătatea publică. Este de așteptat ca datele furnizate de analiza ADN să aibă un impact major asupra stabilirii diagnosticului și prognosticului CRC, precum și asupra depistării persoanelor susceptibile să dezvolte aceste tumori, iar elaborarea strategiilor optime de prevenție și tratament este de neconceput în lipsa datelor privitoare la alterările genetice.

Capacitatea de optimizare a diagnosticului a fost dovedită recent prin identificarea mutațiilor ras în celule din materiile fecale ale bolnavilor cu CRC. Mutațiile ras nu sunt prezente decât la 40—50% din bolnavi, dar investigațiile pot fi adresate și altor mutații, cunoscute a se produce mai timpuriu în evoluția CRC și care, implicit, sunt întâlnite cu frecvență mai mare. Superioritatea acestei metode asupra testului Adler este evidentă, dată fiind lipsa de specificitate a sângerărilor oculte.

Evaluarea prognosticului poate fi, de asemenea, optimizată prin analiza ADN, care este capabilă să identifice markeri asociați cu stadiul evolutiv al CRC. S-a stabilit, de exemplu, că într-un lot de bolnavi cu tumori aflate în stadiul II (fără metastaze în ganglionii locoregionali), subgrupul caracterizat prin prezența ambelor copii 18q a avut, în proporție de 93%, o supraviețuire de peste 5 ani; numai 54% din cei la care a fost prezentă o singură alelă au supraviețuit mai mult de 5 ani. Inactivarea alelică a genei DCC de pe cromozomul 18q a fost evidențiată în majoritatea CRC cu metastaze hepatice, dar numai într-o proporție foarte redusă a tumorilor nemetastazate. Un alt exemplu este oferit de tumorile cu fenotip RER+ (asociat cu sindromul Lynch 1 și cu unele CRC sporadice) al căror prognostic este, de cele mai multe ori, favorabil.

Cea mai importantă dintre aplicațiile posibile ale analizei ADN este depistarea în masă a predispoziției la dezvoltarea CRC. Cu o frecvență de 1 la 200 de indivizi, susceptibilitatea la cancerul colonic nonpolipozic ereditar este cea mai răspândită boală genetică asociată cu neoplazii. Markerul ADN de pe cromozomul 2 este informativ pentru riscul apariției cancerului, iar purtătorii markerului trebuie monitorizați începând de la vârsta de 25 de ani, sau cu 5 ani mai devreme decât vârsta cea mai tânără de debut al bolii în familie. Monitorizarea comportă testarea anuală pentru hemoragii oculte și colonoscopie completă la fiecare doi ani.

Adenomatoza polipozică familială (FAP) răspunde de numai 1% din totalul CRC; gena APC are însă penetranță incompletă și, ca atare, unele dintre cancerele aparent sporadice ar putea fi consecința mutațiilor acestei gene. De aceea, analiza ADN se cere a fi efectuată atât la descendenții presimptomatici ai bolnavilor cu FAP, cât și la rudele de gradul I ale tuturor bolnavilor cu CRC. În cazul decelării mutațiilor APC, rectosigmoidoscopia va trebui să fie efectuată anual, începând de la vârsta de 10—12 ani, și până la cel puțin 40 de ani. Depistată la timp, FAP poate fi oprită în evoluție. Rezecția profilactică a colonului înlătură pericolul apariției CRC la indivizii cu risc crescut. Mortalitatea prin CRC poate fi substanțial redusă prin intervenția chirurgicală practicată în timp util.

Acestea sunt argumentele care justifică screening-ul ADN pentru depistarea predispoziției la CRC, indiferent de costurile acestei acțiuni.

Terapia genică în CRC este un obiectiv mai îndepărtat al geneticii moleculare. Studiile *in vitro* au demonstrat că fenotipul malign poate fi reversat prin transfecția în celulele canceroase a unei alele normale a genei defective. Dificultăți tehnice, pentru moment insurmontabile, se opun unor astfel de abordări în cazul celulelor *in vivo*. De altfel, celulele care și-au dobândit fenotipul malign complet sunt purtătoare ale unui număr mare de alterări, unele încă neidentificate, ceea ce face prea puțin probabilă reușita terapiei genice în cancere. În schimb, introducerea în celule a polinucleotidelor antisens asociată cu administrarea de agenți farmacologici capabili să acționeze suprimând activitatea oncogenelor sau suplinind funcția genelor supresoare inactivate, ar putea să reprezinte o strategie cu șanse de succes.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITARĂ

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Adams J. M., Corys A. — *Transgenic models of tumor development.* Science, 254: 1161—1167, 1991.

Anderson M. L. M., Spandidos D. A. — *Oncogens and onco-suppressor genes in lung cancer.* Respiratory Med., 87: 413—420, 1993.

Antonini P., Venuat A. M., Caillou B. et al. — *Cytogenetic studies on 19 papillary thyroid carcinoma.* Genes, Chromosomes & Cancer, 5: 206—211, 1992.

Aquilina G., Hess P., Branch P. et al. — *A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype.* Genetics, 91: 8905—8909, 1994.

Atkin N. B. — *Non-random chromosomal changes in human neoplasia.* In: *The eukaryotic chromosomes;* Structural and functional aspects, pp. 153—163. Eds. R. C. Soleti and G. Obe. Narosa Publishing House, New Delhi, 1991.

Bardi G., Johansson B., Pandis N. et al. — *Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas, non-random aberrations pattern and correlation with pathologic parameters.* Int. J. Cancer, 55: 422—428, 1993.

Berger R. — *The cytogenetics of haematological malignancies.* Baillierès Clinical Haematology, 5: 791—813, 1992.

Berns A. — *Is p53 the only tumor suppressor gene?* Current Biol., 4: 137—139, 1994.

Bishop J. M. — *Molecular themes in oncogenesis.* Cell, 64: 235—248, 1991.

Bodmer W. F. — *Cancer genetics.* Brit. Med. J., 50: 517—536, 1994.

Brison O. — *Gene amplification and tumor progression.* Biochem. Biophys. Acta, 1155: 25—41, 1993.

Cantley L. C., Auger K. R., Carpenter C. et al. — *Oncogenes and signal transduction.* Cell, 64: 281—302, 1991.

Carey T. E., Van Dyke D. L., Worsham M. J. — *Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in head and neck cancer.* Anticancer Res., 13: 2561—2568, 1993.

Caron H., Sluis P., Roy N. et al. — *Recurrent 1; 17 translocations in human neuroblastoma reveal nonhologous mitotic recombination during the S/G2 phase as a novel mechanism for loss of heterozygosity.* Am. J. Hum. Genet., 55: 341—347, 1994.

Călin G. — *Oncogenes and tumor suppressor genes — two different looks of the same gene?* Oncol. Rep., 1: 987—991, 1994.

Călin G. A., Ştefănescu D. T. — *Can the loss of negative regulation theory be compatible with the development of hematological malignancies?* (review), Oncol. Reports, 2: 875—880, 1995.

Clare N., Hansen K. — *Cytogenetics in the diagnosis of hematologic malignancies.* Diagnostic Hematol., 3: 785—807, 1994.

Cleaver J. E. — *It was a very good year for DNA repair.* Cell, 76: 1—4, 1994.
Cline M. J. — *The molecular basis of leukemia.* New Engl. J. Med., 330: 328—335, 1994.
Cohen G. B., Ren R., Baltimore D. — *Modular binding domains in signal transduction proteins.* Cell, 80: 237—248, 1995.
Coppes M. J., Haber D. A., Grundy P. E. — *Genetic events in the development of Wilms' tumor.* New Engl. J. Med., 331: 586—590, 1994.
Crook T., Marston N. J., Sara E. A., Vousden K. H. — *Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation.* Cell, 79: 817—827, 1994.
Daley G. Q., Van Etten R. A., Baltimore D. — *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome.* Science, 247: 824—830, 1990.
Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L. et al. — *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors.* Nature, 356: 215—221, 1992.
Duggan B. D., Felix J. C., Muderspagh L. I., et al. — *Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma.* J. Natl. Cancer Inst., 86: 1216—1221, 1994.
El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. E. et al. — *WAF 1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* Cell, 75: 817—825, 1993.
Eng C., Ponder B. A. J. — *The role of gene mutations in the genesis of familial cancers.* FASEB J., 7: 910—919, 1993.
Fearon E. R., Vogelstein B. — *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 61: 759—767, 1990.
Feilotter M., Lingner C., Rowley R., Young P. G. — *Regulation of the G2-mitosis transition.* Biochem. Cell Biol., 70: 954—971, 1992.
Fishel R., Lescoe M. K., Rao M. R. S. et al. — *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposos colon cancer.* Cell, 75: 1027—1038, 1993.
Harris C. C. — p53: *at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment.* Science, 262: 1980—1981, 1993.
Harris C. C., Hollstein M. — *Clinical implications of the p53 tumor- suppressor gene.* New Engl. J. Med., 329: 1319—1327, 1993.
Hartwell L. — *Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells.* Cell, 71: 543—546, 1992.
Heim R. A., Lench N. J., Swift M. — *Heterozygous manifestations in four autosomal recessive human cancer-prone syndromes: ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia and Bloom syndrome.* Mutation Res., 282: 25—36, 1992.
Herman J. G., Latif F., Weng Y. et al. — *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 9700—9704, 1994.
Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C. — *p53 mutations in human cancer.* Science, 253: 49—53, 1991.
Hunter T. — *Cooperation between oncogenes.* Cell, 64: 249—270, 1991.
Hunter T. — *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.* Cell, 80: 225—236, 1995.
Israel L. — *The behaviour of metastases from spontaneous human tumors: therapeutic possibilities and limitations.* 1st Forum Bull. Inst. Pasteur, 230—234, 1994.

Jiricny J. — *Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match?* Trends in Genetics, 10: 164—168, 1994.

Johansson B., Bardi G., Dandis N. et al. — *Karyotypic pattern of pancreatic adenocarcinomas correlates with survival and tumour grade.* Int. J. Cancer, 58: 8—13, 1994.

Johansson M., Dietrich C., Mandahl N. et al. — *Karyotypic characterization of bronchial large cell carcinomas.* Int. J. Cancer, 57: 463—467, 1994.

Kern S. E. — *p53 tumor suppression through control of the cell cycle.* Gastroenterology, 106: 1708—1710, 1994.

Klein G. — *Genes that can antagonize tumor development.* FASEB J., 7: 821—825, 1993.

Knudson A. G. — *Antioncogenes and human cancer.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10914—10921, 1993.

Lane D. P. — *The regulation of p53 function.* Int. J. Cancer, 57: 623—627, 1994.

Leach F. S., Nicolaides N. C., Papadopoulos N. et al. — *Mutations of a mut S homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.* Cell, 75: 1215—1225, 1993.

Leutwyler L. — *Deciphering the breast cancer gene.* Scient. American, 40: 2—9, 1994.

Levine A. J. — *The road to the discovery of the p53 protein.* Int. J. Cancer, 56: 775—776, 1994.

Lewin B. — *Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors.* Cell, 64: 303—312, 1991.

Li P., Wood K., Mamon H. et al. — Raf 1: *A kinase currently without a cause but not lacking effects.* Cell, 64: 479—482, 1991.

Longy M., Saura R., Dumas F. et al. — *Chromosome analysis of adenomatous polyps of the colon.* Cancer Genet. Cytogenet., 67: 7—13, 1993.

Mandahl N., Mertens F., Aman P. et al. — *Nonrandom secondary chromosome aberrations in liposarcomas with t(12; 16).* Int. J. Oncol., 4: 307—310, 1994.

Malkin D. — *p53 and the Li-Fraumeni syndrome.* Cancer Genet. Cytogenet., 66: 83—92, 1993.

Marshall C. J. — *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.* Cell, 80: 179—185, 1995.

Marx J. — *Two major signal pathways linked.* Science, 262: 988—990, 1993.

Mead L. J., Gillespie M. T., Irving L. B. et al. — *Homozygous and hemizygous deletions of 9p centromeric to the interferon genes in lung cancer.* Cancer Res., 54: 2307—09, 1994.

Meloni A. M., Dobbs R. M., Pontes J. E. et al. — *Translocation (X; 1) in papillary renal cell carcinoma.* Cancer Genet. Cytogent., 65: 1—6, 1993.

Meltzer P. S. — *MDM 2 and p53: a question of balance.* J. Nat. Cancer Inst., 86: 1265—1266, 1994.

Micale, M. A., Visscher D. W., Gulino S. E. et al. — *Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease.* Human Pathol., 25: 29—35, 1994.

Micale M. A., Mohamed A., Sakr W. et al. — *Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. Clonality and chromosome instability.* Cancer Genet., Cytogenet., 61: 165—173, 1992.

Milsom J. W. — *Pathogenesis of colorectal cancer.* Colorectal Cancer, 73: 1—11, 1993.

Mitelman F. — *Patterns of chromosome variation in neoplasia.* In: *Chromosomal Aberrations, Basic and Applied Aspects.* G. Obe and A. T. Natarajan, Editors. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg, 1989.

Mitelman F. — *Catalog of chromosome aberrations in cancer.* 4th edn. Wiley-Liss, New York, 1991.

Mitelman F., Heim S., Mandahl N. — *Chromosome abnormalities in solid tumors.* In: Ting S. W., Chen J. K., Schwartz M. K. (eds.). Human Tumor Markers, Elsevier, Amsterdam, pp. 75—88, 1989.

Miyashita T., Reed J. C. — *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.* Cell, 30: 293—299, 1995.

Modrigh P. — *Mismatch repair, genetic stability and cancer.* Science, 268: 1959—1960, 1994.

Nichols J., Nimer S. D. — *Transcription factors, translocation and leukemias.* Blood, 80: 2953—2973, 1992.

Nurse P. — *Ordering S phase and M phase in the cell cycle.* Cell, 79: 547—550, 1994.

Orth K., Hung J., Gazdar A. — *Genetic instability in human ovarian cancer cell lines.* Genetics, 91: 9495—9499, 1994.

Pathak S. — *Cytogenetics of epithelial malignant lesions.* Cancer, 70: 1660—1670, 1992.

Pietenpol J. A., Vogelstein B. — *No room at the p53 inn.* Nature, 365: 17—18, 1993.

Prokocimer M., Rotter V. — *Structure and function of p53 in normal cells and their observations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages.* Blood, 84: 2391—2411, 1994.

Rabbits T. H. — *Translocations, master genes and differences between the origins of acute and chronic leukemias.* Cell, 37: 341—644, 1991.

Reik W., Allen N. D. — *Imprinting with and without methylation.* Current Biol., 4: 145—147, 1994.

Renan M. J. — *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data.* Mol. Carcinogenesis, 7: 139—146, 1993.

Roberts T. M. — *A signal chain of events.* Nature, 360: 534—535, 1992.

Ron D. — *Inducible growth arrest: new mechanistic insight.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 1985—1986, 1994.

Rosenberg C., Andersen T. J., Nesland J. M. — *Genetic alterations of chromosome 17 in human breast carcinoma studied by fluorescence in situ hybridization and molecular DNA techniques.* Cancer Genet. Cytogenet., 75: 1—5, 1994.

Van Roy N., Laureys G., Cheng C. N. — *1; 17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines.* Genes, Chromosomes & Cancer, 10: 103—114, 1994.

Santiro M., Carlomagno F., Romano A. et al. — *Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B.* Science, 267: 381—383, 1995.

Sapienza C. — *Genome imprinting and carcinogenesis.* Biochim. Biophys. Acta, 1072: 51—61, 1991.

Savitski K., Bar-Shira A., Gilad S. et al. — *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase,* Science, 268: 1749—1753, 1995.

Sawyers C. L., McLaughlin J., Goga A. et al. — *The nuclear tyrosine kinase c-abl negatively regulates cell growth.* Cell, 77: 121—131, 1994.

Sawyers C. L., Denny C. T. — *Chronic myelomonocytic leukemia: Tel-a-kinase what Ets all about.* Cell, 77: 171—173, 1994.

Schlegelberger B., Weber-Matthiesen K., Himmler A. et al. — *Cytogenetic findings and results of combined immunophenotyping and karyotyping in Hodgkin's disease.* Leukemia, 8: 72—80, 1994.

Shay J. M., Wright W. E., Werbin H. — *Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer.* Int. J. Oncol., 3: 559—563, 1993.

Shekhar P. V. M., Aslakson C. J., Miller F. R. — *Molecular events in metastatic progression.* Cancer Biol., 4: 193—204, 1993.

Solomon E., Borrow J., Goddard A. D. — *Chromosome aberrations and cancer.* Science, 254: 1154—1160, 1994.

Soussi T., Legros Y., Lubin R. et al. — *Multifactorial analysis of p53 alternations in human cancer: a review.* Int. J. Cancer, 57: 1—9, 1994.

Ştefănescu D. T., Coliță D., Moțoiu I., Călin G. — *T-cell malignant lymphoma with a complex unbalanced translocation (8;11;14).* Cancer Genet. Cytogent., 70: 71—73, 1993.

Ştefănescu D. T., Coliță D., Călin C. — *A complex translocation t(1;12;11) in a patient with Hodgkin's disease.* Oncol. Rep., 1 : 837—839, 1994.

Ştefănescu D. T., Coliță D., Nicoară S., Călin G. — t(1;7)(p36; q32): *A new recurring abnormality in primary myelodysplastic syndrome.* Cancer Genet. Cytogenet., 95: 103—105, 1994.

Thiel G., Lasanowa T., Kintzel D. et al. — *Karyotipes in 90 human gliomas.* Cancer Genet. Cytogenet., 58: 109—120, 1992.

Thompson H. F., Liu Y., Emerson J. et al. — *Simple numeric abnormalities as primary karyotype changes in ovarian carcinoma.* Genes, Chromosomes & Cancer, 10: 262—266, 1994.

Thompson H. F., Emerson J., Alberts D. et al. — *Clonal chromosome abnormalities in 54 cases of ovarian carcinoma.* Cancer Genet. Cytogent., 73: 33—45, 1994.

T'sai, Nichols P. W., Hiti A. L. et al. — *Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer.* Cancer Res., 50: 44—47, 1990.

Vogelstein B., Kinzler K. W. — *Has the breast cancer gene been found?* Cell, 79: 1—3, 1994.

Weinberg R. A. — *Tumor suppressor genes.* Science, 254: 1138—1147, 1991.

Young J., Leggett B., Gustafson C. et al. — *Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas.* Human Mut., 2: 351—354, 1993.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nr. plan: 9851.
Bun de tipar: 26.IV.1996.

Tiparul executat sub cda 25/1996,
la Imprimeria de Vest, R.A., Oradea,
str. Mareşal Ion Antonescu nr. 105.
România

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-30-4495-4

LEI 6500

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITARĂ

EDITURA DIDACTICĂ ŞI PEDAGOGICĂ, R.A. BUCUREŞTI